

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Шаповал Андрей Иванович

**Новые костимуляторные молекулы семейства В7 и роль костимуляции
в активации НК-клеток**

03.01.03 – молекулярная биология

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Диссертация
на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор, А.А. Ильичев

Барнаул – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность темы	8
Цели работы.....	10
Научная новизна работы	11
Теоретическая и практическая значимость.....	12
Внедрение результатов работы в практику.....	13
Основные положения, выносимые на защиту	13
Апробация работы и публикации.....	14
Личный вклад автора.....	15
Структура и объем диссертации	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Костимуляторные молекулы	17
1.2 Молекулы семейства В7.....	18
1.3 Молекулярная анатомия молекул семейства В7	19
1.4 В7-1/В7-2/CD28/CTLA-4.....	26
1.5 В7-Н1/В7-DC/PD-1	31
1.6 В7-Н2/ICOS	39
1.7 В7-Н3.....	44
1.8 В7-Н4.....	50
1.9 В7-Н5.....	55
1.10 В7-Н6.....	58
1.11 В7-Н7.....	61
1.12 ILDR2	63
1.13 Бутирофилины.....	65
1.14 Костимуляция НК-клеток	73
1.15 Направления для будущих исследований	75
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	77
2.1 Клеточные линии	77
2.2 Моноклональные антитела и рекомбинантные белки	78

2.3 Поиск новых В7 белковых молекул и получение генов для клонирования ..	79
2.4 Анализ РНК	80
2.5 Трансфекция эукариотических клеточных линий рекомбинантными плазмидами	80
2.6 Получение стабильных клонов опухолевых клеток, экспрессирующих костимуляторные молекулы	81
2.7 Получение рекомбинантных химерных белков	81
2.8 Иммунизация лабораторных животных и получение поликлональных сывороток против В7-НЗ	82
2.9 Выделение моноклеарных клеток периферической крови (МКПК)	83
2.10 Выделение и очистка клеточных популяций	83
2.11 Активация клеток <i>in vitro</i>	84
2.12 Проточная цитометрия	85
2.13 Пролиферация и продукция цитокинов Т-лимфоцитами	85
2.14 Иммуноферментный анализ (ИФА)	87
2.15 Анализ экспрессии мРНК различных цитокинов	89
2.16 Генерация ЦТЛ и оценка цитотоксичности	90
2.17 Генерация дендритных клеток (ДК)	91
2.18 Антисмысловые олигонуклеотиды и дендритные клетки (ДК)	91
2.19 Мыши	92
2.20 Получение клеточных суспензий	92
2.21 Рост опухолей и пролиферация ЦТЛ <i>in vivo</i>	93
2.22 Иммунизация лабораторных животных с овалбумином (OVA)	94
2.23 Стимуляция и приготовление клеток для панели ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)	94
2.24 Активация $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, прайминг НК-клеток и их совместное культивирование	96
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	99
3.1 Клонирование и характеристика В7-НЗ	99
3.2 Экспрессия В7-НЗ мРНК в органах, тканях и клетках человека	103
3.3 Экспрессия В7-НЗ на поверхности клеток иммунной системы	104

3.4 Предполагаемый В7-Н3 рецептор экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах.....	107
3.5 Взаимодействие В7-Н3 с известными рецепторами В7 лигандов.....	108
3.6 В7-Н3 молекула костимулирует Т-клеточный ответ	109
3.7 Эффект В7-Н3 на цитотоксические Т-лимфоциты	110
3.8 В7-Н3 селективно индуцирует продукцию IFN- γ	111
3.9 Исследование корреляции между экспрессией В7-Н3 и продукцией IFN- γ	114
3.10 Эффект мышиной В7-Н3 молекулы на костимуляцию Т-лимфоцитов	115
3.11 Формирование стабильных клонов Р815 опухоли, экспрессирующих В7-Н3.....	116
3.12 Эффект В7-Н3 экспрессии на рост опухолей <i>in vivo</i>	117
3.13 Клеточные механизмы отторжения опухолей, экспрессирующих В7-Н3.....	118
3.14 Эффект В7-Н3 на пролиферацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов <i>in vivo</i>	120
3.15 Эффект В7-Н3 на пролиферацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов <i>in vitro</i>	122
3.16 Клонирование и характеристика BTNL8	122
3.17 Экспрессия мРНК, кодирующей изоформы BTNL8	127
3.18 Анализ экспрессии рецептора для BTNL8	128
3.19 Связывание BTNL8Ig с известными рецепторами семейства В7.....	130
3.20 Костимуляция Т-клеточной пролиферации с BTNL8 молекулой	131
3.21 BTNL8 увеличивает продукцию цитокинов <i>in vitro</i>	132
3.22 BTNL8 усиливает первичный гуморальный ответ <i>in vivo</i>	134
3.23 Костимуляция натурального иммунного ответа	136
3.24 Эффект культивирования НК-клеток с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами на противоопухолевую цитотоксичность	138
3.25 Роль межклеточных взаимодействий в активации НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами.....	141
3.26 Экспрессия костимуляторных молекул на активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах и НК-клетках	142
3.27 Роль CD137 и CD137L взаимодействия в активации НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами.....	143

3.28 Эффект CD137/CD137L взаимодействия на цитотоксическую активность NK-клеток	145
3.29 Роль NKG2D в NK-опосредованной цитотоксичности	147
3.30 Регуляция NKG2D экспрессии через CD137	148
3.31 Эффект препаратов, применяемых в клиниках на активацию NK-клеток	149
3.32 Эффекты Зометы и МАТ на цитотоксическую активность NK-клеток.....	151
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	154
ВЫВОДЫ.....	172
ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	174
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	175

Сокращения

- AS (antisense oligonucleotides) – антисмысловые нуклеотиды
- BTLA – B- and T-lymphocyte attenuator
- BTN (butyrophilin) – бутирофилин
- BTNL (butyrophilin-like) – бутирофилин-аналог
- CFCE – Carboxyfluorescein succinimidyl ester
- CPM – counts per minutes
- CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) – (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4)
- EGFR – epithelial growth factor receptor
- EST – expressed sequence tag
- FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная телячья сыворотка
- GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- GM-CSF – granulocyte macrophage-colony stimulating factor
- HCASMC – Human coronary artery smooth muscle cells
- hIgG – human immunoglobulin class G
- HPAEC – Human Pulmonary Artery Endothelial Cells
- HRP – horseradish peroxidase
- HUVEC – Human umbilical vein endothelial cells
- HVEM – herpes virus entry mediator
- i.v. (intravenous) – внутривенно
- Ig – immunoglobulin
- IgG – immunoglobulin class G
- IL (interleukin) – интерлейкин
- IPP – isopentenyl-pyrophosphate
- ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) – тирозиновый ингибиторный мотив иммунорецепторов
- KLH (keyhole limpet haemocyanin) – гемоцианин лимфы улитки
- НК-клетки – натуральные (естественные) киллеры

OVA – ovalbumin

P1A-ЦТЛ – ЦТЛ против опухолевого антигена P1A

s.c. (subcutaneous) – подкожно

TCR (T cell receptor) – Т-клеточный рецептор

TMB (tetramethylbenzidine) – субстрат для ИФА

TNF – tumor necrosis factor

а.о. – аминокислотных остатков

АЗКЦ – антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ИКТ – иммунологические контрольные точки

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПС – липополисахарид

МАТ – моноклональные антитела

МКПК – моноклеарные клетки периферической крови

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ОАА – опухоль ассоциированные антигены

п.н. – пара нуклеотидов

ПЖЖ – поджелудочная железа

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ФГА – фитогемагглютинин

ФМА – форбол миристат ацетат

ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетат

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЩЖ – щитовидная железа

ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Изучение роли костимуляторных молекул в иммунном ответе представляет собой важное направление современной иммунологии. Молекулярные взаимодействия между различными типами клеток обеспечивают развитие, поддержание и завершение иммунного ответа в норме, а также определяют исход патологических процессов. Важную роль в регуляции иммунного ответа и воспалительных процессов играют костимуляторные молекулы, которые также называют иммунологическими точками контроля (ИКТ).

В соответствии с современными представлениями, оптимальная активация Т-лимфоцитов требует двух сигналов: первый сигнал обеспечивается взаимодействием TCR (T cell receptor) с антигенным пептидом в контексте МНС (Major Histocompatibility Complex), второй сигнал обеспечивают костимуляторные молекулы. основополагающие работы дают основания утверждать, что сигнал только через TCR в отсутствие костимуляции приводит к развитию Т-клеточной анергии, или неспособности Т-лимфоцитов отвечать на последующее взаимодействие с антигеном (Schwartz *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 1990). Таким образом, было постулировано, что костимуляция играет ключевую роль в определении исхода взаимодействия Т-лимфоцитов хелперов (CD4+ helper T cells) с антигеном, представленным в контексте МНС класса II антигенпрезентирующими клетками (АПК). Критическая роль костимуляции в регуляции иммунного ответа мотивировала усиление интереса к ее изучению, что привело к значительному росту исследований в этой области.

Данные о первых костимуляторных молекулах были опубликованы в конце 1980-х годов (June *et al.*, 1987). Было показано, что молекулы, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов, способны

стимулировать или ингибировать иммунный ответ на антиген. Важно отметить, что к суперсемейству иммуноглобулинов также принадлежат сами иммуноглобулины, молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex) и Т-клеточные рецепторы, т.е. все основные молекулы, участвующие в иммунном ответе. Все белки суперсемейства иммуноглобулинов имеют сходную структуру: они состоят из одного или нескольких переменных (variable (V)) и/или константных (constant (C)) доменов (Bajorath, Peach and Linsley, 1994). Первый костимуляторный лиганд был назван В7 (от **B** cell-restricted activation Ag **7**) (Freeman *et al.*, 1989). Позднее был обнаружен еще один лиганд, который был назван В7-2 (Freeman *et al.*, 1993). На основе В7-1 и В7-2 (CD80 и CD86 соответственно) из суперсемейства иммуноглобулинов было выделено В7 семейство костимуляторных молекул. Позднее В7 семейство молекул пополнилось новыми членами, о которых пойдет речь дальше.

Первые работы по изучению роли новых членов суперсемейства иммуноглобулинов в регуляции иммунного ответа определили функцию CD28 молекулы как рецептора, стимулирующего активацию наивных Т-лимфоцитов (June *et al.*, 1990), и показали, что члены семейства В7 молекул, В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86) являются лигандами этого рецептора (Azuma *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1989; Freeman *et al.*, 1993). Позднее было обнаружено, что молекула, гомологичная CD28, и названная CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4), также взаимодействует с В7-1 и В7-2 (Brunet *et al.*, 1987; Linsley *et al.*, 1991). Дальнейшие эксперименты с использованием нокаутных мышей показали, что CTLA-4 доставляет сигнал в Т-клетки, который снижает их активацию (Waterhouse *et al.*, 1995; Tivol *et al.*, 1995). Это дало основание заключить, что костимуляторные лиганды могут вызвать как активацию, так и ингибирование иммунного ответа, в зависимости от того, с каким рецептором они взаимодействуют. Дифференциальная экспрессия лигандов и рецепторов, индуцирующих

активирующие и ингибирующие сигналы, обеспечивает регуляцию иммунного ответа.

Взаимодействие между В7-1/В7-2:CD28/CTLA-4 является одним из наиболее хорошо изученных молекулярных путей костимуляции. Сегодня обнаружены новые костимуляторные молекулы, которые относятся к суперсемействам иммуноглобулинов и фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor). Благодаря полученным знаниям о костимуляторных молекулах были разработаны терапевтические средства для лечения инфекционных онкологических и аутоиммунных заболеваний, отторжения органов при трансплантации.

Обнаружение новых костимуляторных молекул и изучение их функций несомненно позволит не только более полно понять тонкие механизмы активации и регуляции Т-лимфоцитов, но и разработать средства для манипуляции иммунным ответом в норме и патологии.

Цели работы

Целью данной работы было исследование роли новых костимуляторных молекул в регуляции адаптивного и врожденного иммунного ответа.

В ходе работы было необходимо решить следующие основные задачи:

1. С помощью методов биоинформатики найти новые молекулы, гомологичные известным членам семейства В7 костимуляторных молекул.
2. Провести клонирование генов, кодирующих новые костимуляторные молекулы в клетках эукариот.
3. Разработать молекулярные инструменты для изучения функциональной активности новых костимуляторных лигандов.
4. Изучить экспрессию новых костимуляторных молекул в различных тканях и клетках человека.

5. Исследовать влияние рекомбинантных форм костимуляторных молекул на пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов *in vitro*.
6. Оценить влияние новых костимуляторных молекул на регуляцию антиген-специфического иммунного ответа *in vivo*.
7. Исследовать роль костимуляторных молекул в активации НК-клеток.

Научная новизна работы

Обнаружена новая костимуляторная молекула В7-Н3 (В7 Homolog 3), которая принадлежит к семейству В7, выяснена ее функциональная активность. В ходе выполнения работы созданы рекомбинантные химерные белки и клеточные линии, которые были использованы для изучения функциональной активности В7-Н3. Впервые показано, что В7-Н3 взаимодействует с Т-лимфоцитами, вызывает усиленную продукцию IFN- γ , и как следствие этого, активирует цитотоксические CD8 Т-лимфоциты. В7-Н3 активирует противоопухолевый иммунитет и вызывает генерацию иммунологической памяти против опухоли.

Впервые продемонстрирована роль молекулы BTNL8 (Butyrophilin-like 8), принадлежащей к семейству бутирофилинов, в регуляции иммунного ответа. Выявлено взаимодействие внеклеточной части молекулы BTNL8 с Т-лимфоцитами. В экспериментах *in vivo* показано, что BTNL8 может стимулировать первичный иммунный ответ.

Впервые показано, что для оптимальной активации НК-клеток необходимы два сигнала. Первым сигналом является взаимодействие иммуноглобулинов с Fc-рецептором, второй сигнал доставляется внутрь клетки через костимуляторные молекулы. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты экспрессируют CD137L (4-1BBL) молекулу (из семейства TNF), которая играет важную роль в костимуляции НК-клеток. CD137L усиливает экспрессию NKG2D рецептора, который опосредует цитотоксическую активность НК-клеток.

Бисфосфонаты, которые применяются для терапии онкологических заболеваний (Золедронат, или Зомета), индуцируют активацию $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, увеличивают экспрессию CD137L, что приводит к усилению прямой и антителозависимой цитотоксичности НК-клеток против опухолей.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что в ней описаны две новые костимуляторные молекулы В7-Н3 и BTNЛ8 с уникальными свойствами, расширяющими наши представления об участии костимуляторных молекул в регуляции иммунного ответа. Так, описаны особенности экспрессии новых костимуляторных молекул в различных органах и тканях человека. Определена экспрессия предполагаемых рецепторов на Т-лимфоцитах, взаимодействующих с новыми костимуляторными лигандами, представленными на АПК. Предложено использовать рекомбинантные химерные белки, содержащие внеклеточную часть костимуляторных молекул, для регуляции иммунного ответа. Выявлено, что В7-Н3 и BTNЛ8 играют ключевую роль в активации противоопухолевого антиген-специфического ответа.

Полученные результаты о функциональной активности и экспрессии В7-Н3 позволили приступить к клиническим испытаниям моноклональных антител против В7-Н3 для терапии онкологических заболеваний. В настоящее время проводится 11 клинических испытаний, где изучается безопасность и терапевтические эффекты МАТ против В7-Н3 на пациентах с различными онкологическими заболеваниями, которые не чувствительны к другим видам терапии (Flem-Karlsen *et al.*, 2018).

На основании полученных результатов было предположено, что для активации клеток естественного иммунитета, таких как НК-клетки, требуются два сигнала. Первый сигнал передается через Fc-рецептор иммуноглобулинов, а второй костимуляторными молекулами. В частности,

CD137L, который экспрессируется на активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах и таким образом обеспечивает костимуляцию НК-клеток после контакта с иммобилизованными иммуноглобулинами.

Результаты работы позволили предложить модель для улучшения существующих методов иммунотерапии онкологических заболеваний. Комбинирование опухолеспецифических МАТ, которые взаимодействуют с Fc-рецептором на НК-клетках (Цетуксимаб и Ритуксимаб), и агентов, активирующих $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, применяемых в клиниках, такие как, Зомета (Zometa), может улучшить иммунотерапию рака через активацию адаптивного и естественного иммунитета.

Внедрение результатов работы в практику

В настоящее время проводятся 11 клинических испытаний, спонсированных компанией MacroGenics (США), где МАТ против В7-Н3 используются в качестве монотерапии или в комбинации с другими МАТ (Ипилимумаб/анти-CTLA-4 и Пембролизумаб/анти-PD-1) для терапии рака простаты, поджелудочной железы, яичника, желудка, рака легкого и др.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы для разработки клинического протокола по применению комбинации Зометы и МАТ (Цетуксимаб и Ритуксимаб) для терапии лимфомы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи. Кроме того, возможно использование рекомбинантных химерных белков костимуляторных молекул для повышения эффективности существующих вакцин против инфекций и онкологических заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В7-Н3 молекула является новым представителем семейства костимуляторных молекул В7. В присутствии антигенного сигнала В7-

- НЗ вызывает усиление активации Т-лимфоцитов и активирует противоопухолевый иммунный ответ.
2. BTNL8 принадлежит к семейству бутирофилинов и обладает костимуляторными свойствами. BTNL8 взаимодействует с неизвестным рецептором на поверхности покоящихся Т-клеток и способен костимулировать пролиферацию и продукцию цитокинов Т-лимфоцитами. Инъекция BTNL8Ig химерного рекомбинантного белка во время иммунизации приводит к усилению первичного иммунного ответа.
 3. Для оптимальной активации NK-клеток требуется два сигнала. Первый доставляется через взаимодействие иммуноглобулинов с Fc-рецептором, второй обуславливается CD137 костимуляторной молекулой. Бисфосфанаты вызывают экспрессию CD137, костимуляторной молекулы, на поверхности $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, которая обеспечивает активацию NK-клеток, примированных с иммобилизованными иммуноглобулинами. Через увеличение экспрессии CD137 бисфосфанаты усиливают прямую и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) NK-клеток.

Апробация работы и публикации

Основные результаты работы опубликованы в 21 статье в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, включая Nature Medicine, Nature Immunology, Immunity, Blood, Journal of Immunology, Clinical Cancer Research, Molecular Biotechnology, Cancer Research, Molecular Immunology, Cancer Immunology and Immunotherapy. Результаты диссертационной работы доложены на международных конференциях,

включая Annual meetings of the American Association of Immunologists, Experimental Biology, FASEB, American Association of Cancer Research и др. Также результаты и методы, используемые в работе, опубликованы в двух главах книг. Часть первичных данных для диссертации получены в Клинике Мэйо (Mayo Clinic), г. Рочестер, Миннесота, США (1998-2002); компании CuraGen, г. Брэнфорд, Коннектикут, США (2005-2008); университете Мэриленда, г. Балтимор, Мэриленд, США (2008-2012); университете штата Аризона, г. Темпи, Аризона, США (2013-2018).

Личный вклад автора

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований, обсуждения результатов и списка литературы, заключения. Диссертация изложена на 219 страницах, включает в себя 4 таблицы и 44 рисунка. Список цитируемой литературы состоит из 319 источников, из них 2 отечественные и 317 иностранные.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представленный обзор литературы описывает молекулы и клетки, участвующие в контроле иммунитета. Иммунный ответ регулируется изысканной системой, которая позволяет поддерживать баланс между защитным иммунитетом против различных патогенов и толерантностью к своим клеткам, органам и тканям. Набор молекул, которые названы костимуляторными молекулами (также их называют иммунологическими точками контроля, от англ. immune checkpoints), контролируют функциональную активность клеток врожденной и специфической иммунной системы. Стимуляторные точки контроля обеспечивают активацию наивных Т-лимфоцитов, а также эффекторов, клеток иммунологической памяти и супрессорных (регуляторных) Т-лимфоцитов. Ингибирующие точки контроля ограничивают порог активации Т-клеток и продолжительность иммунного ответа, а также обеспечивают завершение воспалительных процессов, толерантность и гомеостаз.

К костимуляторным молекулам в основном относят молекулы семейств B7 и TNF, однако в последнее время появляются сообщения, что молекулы других семейств, таких как бутирофилины, семафорины, плексины и другие также могут регулировать иммунный ответ. Одна из глав представленного обзора посвящена бутирофилинам и их иммунологическим функциям.

Как правило, феномен костимуляции рассматривают как основной механизм для регуляции Т-лимфоцитов. Недавние публикации представляют доказательства, что клетки врожденного иммунитета также требуют костимуляторного сигнала. В обзоре обсуждается регуляция функции НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами. В этом процессе участвуют лиганды семейства B7 и TNF. В обзоре также описаны возможности манипуляции костимуляторными молекулами для терапии аутоиммунных, онкологических и других заболеваний.

1.1. Костимуляторные молекулы

Молекулярный контакт Т-лимфоцитов с другими клетками организма необходим для начала, поддержания и завершения иммунного ответа на различные патогены. Для оптимальной активации Т-лимфоцитов требуется, по крайней мере, два сигнала. Первый сигнал обеспечивается взаимодействием Т-клеточного рецептора (TCR: T Cell Receptor) с антигенным пептидом, представленным в контексте МНС (Major Histocompatibility Complex). Однако первого сигнала недостаточно для активации Т-клеток. Еще нужен второй сигнал, обеспечиваемый костимуляторными молекулами, которые определяют величину и эффективность иммунного ответа. К костимуляторным молекулам в настоящее время относят около 70 мембранных белков. Основные из них принадлежат семейству В7, часть суперсемейства иммуноглобулинов, и семейству TNF (Tumor Necrosis Factors). На основе функциональной активности костимуляторные молекулы могут быть классифицированы как стимулирующие – усиливающие первый сигнал через TCR, и ингибирующие – ослабляющие сигнал через Т-клеточный рецептор. По исторически сложившейся номенклатуре к костимуляторным лигандам относят молекулы, экспрессируемые на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК), в то время как их рецепторы экспрессируются на Т-лимфоцитах. Однако сегодня известно, что костимуляторные лиганды могут экспрессироваться на различных клетках в разных органах. А рецепторы для костимуляторных лигандов экспрессируются на других клетках иммунной системы и не только на Т-лимфоцитах.

Преобладание ингибирующего сигнала или отсутствие костимулирующего не только приводит к супрессии иммунного ответа, но в ряде случаев индуцирует антиген-специфическую толерантность (см. рис. 1).

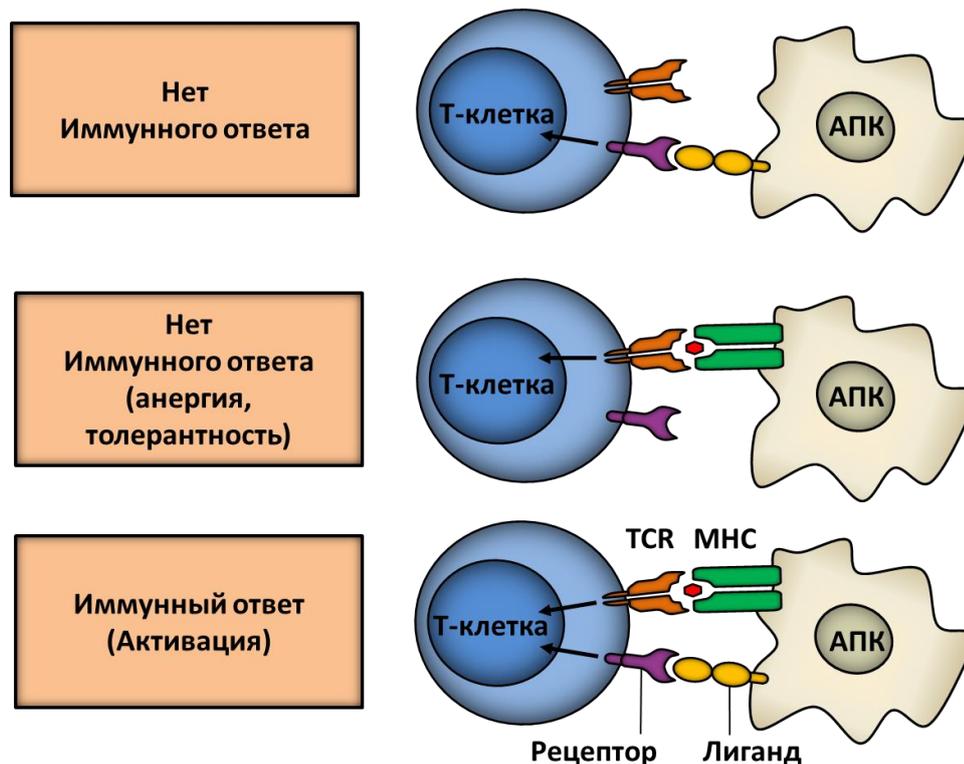


Рисунок 1. Модели активации т-лимфоцитов.

а) Двухсигнальная модель Т-клеточной активации. В этой модели первый сигнал доставляется через TCR, после связывания с пептидом, представленным в контексте МНС молекул, в то время как второй сигнал обуславливается взаимодействием стимулирующего рецептора и его лиганда. Синергизм двух сигналов приводит к оптимальной активации Т-клеток. В отсутствие костимулирующего сигнала активации Т-клеток не происходит, в некоторых случаях отсутствие второго сигнала приводит к Т-клеточной толерантности и анергии. Функции костимуляторных молекул полностью зависят от первого сигнала, так как без первого сигнала взаимодействие костимуляторного рецептора на Т-клетках не приводит к их активации. б) Роль ингибирующих и костимулирующих молекул в регуляции TCR сигнала. TCR сигнал необходим для активации Т-клеток, однако сигналы через костимулирующие или ингибирующие рецепторы определяют исход взаимодействия Т-лимфоцитов с антигеном. Регуляция антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа осуществляется через баланс между костимулирующими и ингибирующими сигналами, которые часто доставляются в Т-лимфоциты одновременно клетками тканей, где происходит развитие иммунного ответа.

1.2 Молекулы семейства В7

Члены семейства молекул В7 – наиболее хорошо изученные иммуномодуляторные молекулы. Семейство В7 состоит из молекул, которые проявляют как ингибирующие, так и стимулирующие свойства. Это семейство включает такие молекулы, как В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), CD28, CTLA4, PD1, PD1 ligand (PDL1, В7-Н1), PDL2 (В7-DC), В7-Н2 (В7RP1, ICOSL), ICOS, В7-Н3, В7-Н4, VISTA, В7-Н6, В7-Н7 и ILDR2. Открытие новых В7 молекул предоставляет новые возможности для терапевтических манипуляций иммунным ответом при лечении различных заболеваний.

Экспрессия лигандов В7 на лимфоидных и на нелимфоидных клетках говорит об их роли в регуляции иммунитета в центральных органах иммунной системы и в периферических тканях. Было обнаружено, что некоторые лиганды семейства В7 встречаются и на опухолевых клетках (таблица 1). Манипуляции молекулами семейства В7, а также другими молекулами, регулирующими иммунный ответ, предоставляют новые возможности для иммунотерапии онкологических и других заболеваний. Одним из наиболее надежных и специфических способов манипуляции различными молекулярными мишенями являются антитела, подробно применение антител в терапевтических целях описано в обзоре Луговского (Луговской, 2017). В этом разделе диссертации будут рассмотрены функциональные особенности молекул семейства В7 и обсуждены возможности их терапевтического использования.

1.3 Молекулярная анатомия молекул семейства В7

Все 11 описанных на настоящий момент лигандов семейства В7 представляют собой трансмембранные белки I-го типа, сигнальный N-конец которых направлен во внеклеточное пространство. Несмотря на относительно низкий процент идентичных аминокислотных остатков (а.о.) в белках семейства В7 (19-40 %) (см. рис. 2 и табл. 1), их вторичная и третичная структуры очень похожи и характеризуются внеклеточными IgV и

IgC доменами, гомологичными вариабельному и константному домену иммуноглобулинов (Schwartz *et al.*, 2002). IgV и IgC домены молекул семейства B7 кодируются отдельными экзонами, дополнительные экзоны кодируют сигнальный пептид, трансмембранный и цитоплазматические участки. Изоформы B7-1, B7-2, ICOS-L, B7-H3 и PD-L2, образованные путем альтернативного сплайсинга, описаны в литературе (Ling *et al.*, 2003; Borriello *et al.*, 1994; Borriello *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1995; Ling *et al.*, 2001b; He *et al.*, 2004), однако их функциональное значение остается неизученным. Цитоплазматический домен молекул семейства B7 короткий, обычно состоит из 19-62 а.о. и может кодироваться несколькими экзонами. Функции внутриклеточных доменов полностью не изучены, все они содержат остатки серина, треонина или тирозина, которые потенциально могут фосфорилироваться и участвовать в передаче сигнала внутрь клетки. Было показано, что B7-1 и B7-H4 могут доставлять активирующий сигнал внутрь клетки после связывания с рецептором (Song *et al.*, 2008; Orabona *et al.*, 2004).

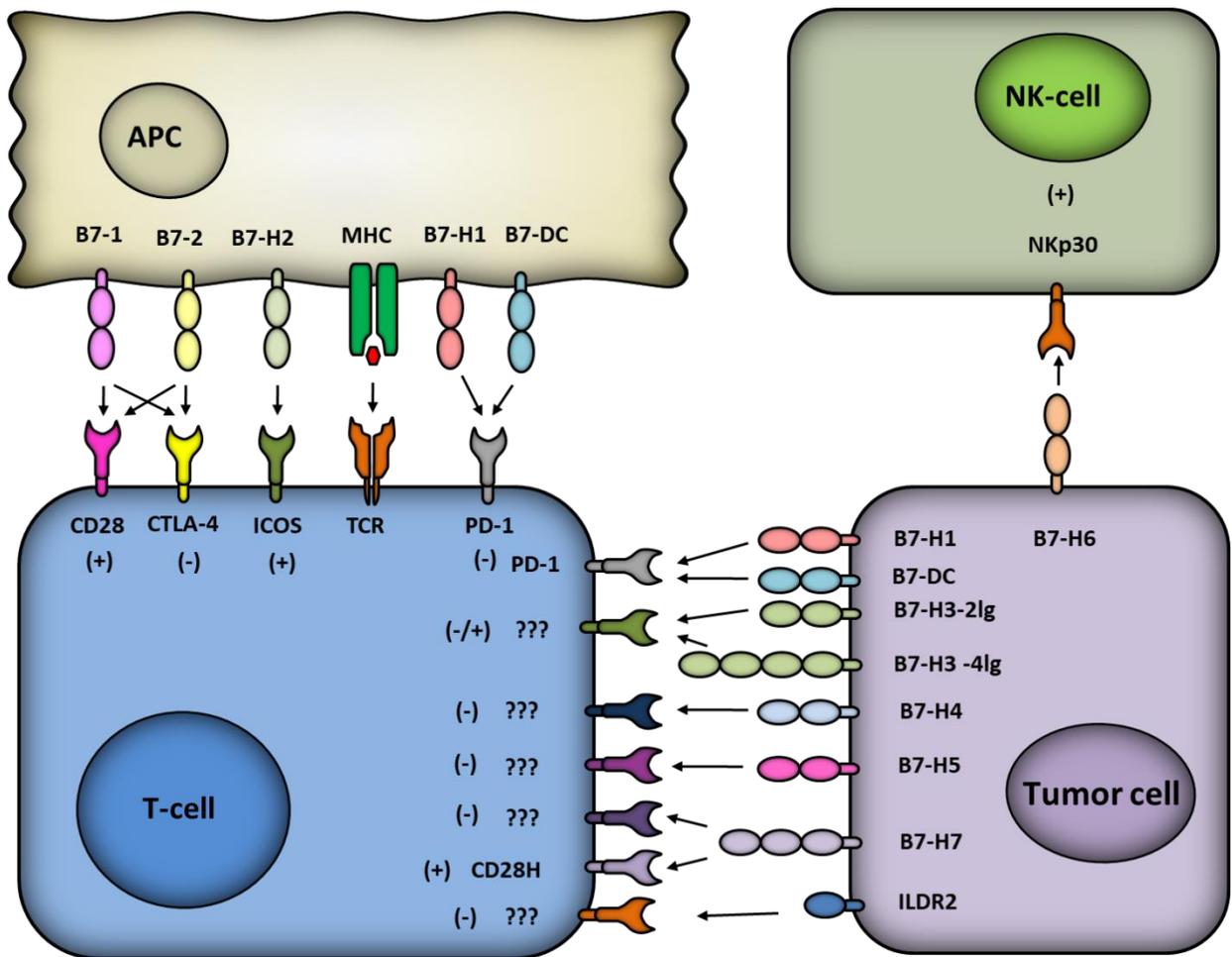


Рисунок 2. Молекулы контроля иммунитета семейства B7.

Стимулирующие сигналы обеспечиваются взаимодействием CD28 с B7-1 и B7-2, ICOS с B7-H2, NKp30 с B7-H6 и CD28H с B7-H7, усиливают активацию Т-лимфоцитов (нормальных киллеров в случае NKp30 – B7-H6). Ингибирующие сигналы обеспечиваются взаимодействием PD-1 с B7-H1 и B7-DC, CTLA-4 с B7-1 и B7-2. Пока еще остаются неизвестны рецепторы для B7-H3, B7-H4 и B7-H5. Костимулирующие рецепторы обозначены символом (+), ингибирующие – символом (-).

Таблица 1. Характеристика лигандов семейства B7

Название лиганда (альтернативное название)	Структура внеклеточного домена	Экспрессия на лимфоидных клетках	Экспрессия мРНК в нелимфоидных клетках и тканях	Соответствующий лиганду рецептор	Вид взаимодействия рецептор-лиганд	Расположение на хромосоме	
						У человека	У мыши
B7-1 (CD80)	IgV-IgC-	Т- и В-клетки, ДК, моноциты	Раковые клетки поджелудочной железы, меланомы, миеломы, острый миелоидный лейкоз, карцинома	CD28 CTLA-4 (CD152)	Активация Ингибирование	3q13.33	16qB4
B7-2 (CD86)	IgV-IgC-	Конститутивны, повышается через активацию В-клеток, ДК и моноцитов, индуцируется на Т-клетках	Клетки меланомы, миеломы, острый миелоидный лейкоз, карцинома	CD28 CTLA-4 (CD152)	Активация Ингибирование	3q13.33	16qB4

B7-H1 (PD-L1, CD274)	IgV-IgC-	Конститутивны й, повышается через активацию В- клеток, ДК и моноцитов, индуцируется в Т-клетках	Плацента, сердце, поджелудочная железа, легкие, печень и опухолевые клетки (карциномы и меланомы)	PD-1 Неизвестен	Активация Ингибирование	9p24.1	19qC1
B7-H2 (ICOS-L GL-50, B7h, B7RP- 1)	IgV-IgC-	Конститутивны й на В-клетках, ДК, макрофагах и субпопуляции Т-лимфоцитов	Легкие, печень, почки и яички	ICOS	Активация	21p12	10qC1
B7-DC (PD-L2, CD273)	IgV-IgC-	ДК и моноциты	Плацента, легкие, печень, кератиноциты и эпителиальные клетки, раковые клетки шейки матки	PD-1 Неизвестен	Активация Ингибирование	9p24.1	19qC1

B7-H3 (CD276)	IgV-IgC- или IgV-IgC-IgV- IgC-	T-, B-клетки, ДК и моноциты	Сердце, почки, яички, легкое, печень, поджелудочная железа, простата, прямая кишка и остеобласты, разнообразные раковые клетки	Неизвестен Неизвестен	Активация Ингибирование	15q24.1	9qB4
B7-H4 (B7x, B7S1, Vtcn1)	IgV-IgC-	T-, B-клетки, ДК и моноциты	Плацента, матка, яички, почки, легкие, сердце и мозг, разнообразные раковые клетки	Неизвестен	Ингибирование	1q13.1	3qF2.2
B7-H5 (VISTA, GI24, Dies1, PD- 1H)	IgV-IgC-	T-, но не B- клетки, NK	Плацента, разнообразные раковые клетки	Неизвестен	Ингибирование	10q22.1	10qB4
B7-H6 (NCR3LG1)	IgV-IgC-	CD14+CD16+ моноциты, нейтрофилы	Опухолевые клетки, не экспрессируется на нормальных клетках	NKp30	Активация	11p15.1	Нет

B7-H7 (HLA2, некоторое время использова лся термин B7-H5)	IgV-IgC-IgV-	Моноциты/мак рофаги	Плацента, кишечник, почки, молочная железа, желчный пузырь. Раковые клетки молочной железы, яичников, легких, печени, почек, поджелудочной железы, пищевода, щитовидной железы, мочевого пузыря, прямой кишки, простаты, меланомы	CD28H Неизвестен	Активация/ингиби рование	3q13.13	Нет
ILDR2	IgV	Моноциты, макрофаги, НК	Яички, головной мозг, почки, сердце, кишечник	Неизвестен	Ингибирование	1q24.1	Chr1

1.4 В7-1/В7-2/CD28/CTLA-4

Идентификация В7-1 и В7-2

Первое сообщение о феномене костимуляции было сделано в 1985 году, когда было показано, что антитела против молекулы Т44 (позднее переименованной в CD28) вызывают усиление продукции IL-2 Т-лимфоцитами в присутствии аллоантигенов или моноклональных антител (МАТ) против молекулы CD3 Т-клеточного рецептора (Moretta *et al.*, 1985). Два года спустя, в 1987 году, было опубликовано сообщение о клонировании последовательности ДНК, кодирующей молекулу CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4) (Brunet *et al.*, 1987), в дальнейшем была показана гомология аминокислотной последовательности и структуры молекул CD28 и CTLA-4 (Harper *et al.*, 1991). Молекулы В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86) были идентифицированы как лиганды, взаимодействующие с рецепторами CD28 и CTLA4, в начале 90-х годов (Linsley, Clark and Ledbetter, 1990; Azuma *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1993). Несмотря на то, что у лигандов В7-1 и В7-2 имеется только 25 % аминокислотной идентичности (Collins, Ling and Carreno, 2005), они оба связываются с рецепторами CD28 и CTLA-4. Первые результаты указывали на то, что оба рецептора имеют костимулирующую функцию и усиливают активацию Т-лимфоцитов при наличии антигенного сигнала. Однако в дальнейшем было экспериментально доказано, что рецептор CTLA-4 выполняет ингибирующую функцию на поверхности Т-лимфоцитов (Waterhouse *et al.*, 1995; Tivol *et al.*, 1995). Таким образом, было показано, что костимулирующие рецепторы, связывающиеся с аналогичными лигандами, могут доставлять как ингибирующие, так и стимулирующие сигналы Т-лимфоцитам. Соответственно, связывание лигандов В7-1 и/или В7-2 с рецептором CD28 вызывает ко-стимуляцию иммунного ответа, в то время как

взаимодействие тех же лигандов с рецептором CTLA-4 ингибирует активацию Т-лимфоцитов (табл. 1).

Экспрессия В7-1 и В7-2 и их рецепторов CD28 и CTLA-4

Лиганды В7-1 и В7-2 представлены на поверхности таких АПК, как дендритные клетки (ДК), активированные моноциты, клетки Лангерганса и В-лимфоциты (Freeman *et al.*, 1991; Lenschow *et al.*, 1994; Symington, Brady and Linsley, 1993). Показано, что экспрессия В7-2 на клеточной поверхности обычно слабо выражена на покоящихся АПК и резко увеличивается сразу после их активации, в то время как В7-1 экспрессируется на АПК на более поздних стадиях активации (Freeman *et al.*, 1993; Nathcock *et al.*, 1994). Экспрессия В7-2 на ранних стадиях активации АПК предполагает, что молекула В7-2 наиболее важна для запуска иммунного ответа, что было подтверждено *in vivo* с использованием нокаутных мышей (Garcia, Martin and Michalek, 2004). В целом, молекулы В7-1 и В7-2 имеют аналогичные функции (McAdam, Schweitzer and Sharpe, 1998). Следует отметить, что лиганд В7-1 связывается с рецептором CTLA-4 с большей аффинностью, чем В7-2 (Collins, Ling and Carreno, 2005). Данный факт говорит о том, что CTLA-4 может снижать стимулирующий сигнал от CD28 не только напрямую, а также через снижение представленности В7-1 и В7-2 АПК. Оба рецептора, CTLA-4 и CD28, взаимодействуют с В7-1 и В7-2, как говорилось выше, при этом CTLA-4 связывается с большей аффинностью, что обеспечивает эффективное соперничество с CD28 за связывание со специфическими лигандами. CTLA-4 может также снижать представленность В7-1 и В7-2 на поверхности клеток за счет механизма транс-эндоцитоза (Qureshi *et al.*, 2011), таким образом снижая доступность лигандов для стимулирующего рецептора CD28.

Отличия в функциональной активности лигандов В7-1 и В7-2, описанные в литературе, могут быть объяснены экспрессией молекул на различных типах клеток, во время разных стадий развития иммунного ответа, однако, возможно, существуют и уникальные функциональные активности каждой молекулы.

Профиль экспрессии рецепторов CD28 и CTLA-4 на поверхности клеток различен. CD28 конститутивно представлены на поверхности 80 % Т-лимфоцитов человека и практически на всех Т-клетках мыши (Linsley and Ledbetter, 1993; June *et al.*, 1990). Взаимодействие CD28 с В7-1 и/или В7-2 в отсутствие сигнала через TCR обычно не имеет никакого физиологического эффекта. CD28 регулирует порог активации Т-лимфоцитов и значительно снижает общее количество TCR, взаимодействующих с антигеном, необходимое для эффективной активации Т-клеток (Viola and Lanzavecchia, 1996). Во время активации Т-лимфоцитов количество CD28 на их поверхности может увеличиваться, однако связывание CD28 с лигандами или анти-CD28 МАТ приводит к снижению уровня мРНК, кодирующей CD28 (Turka *et al.*, 1990; Linsley *et al.*, 1993).

Рецептор CTLA-4 обнаруживается только на активированных, но не покоящихся Т-лимфоцитах (Linsley *et al.*, 1992; Alegre *et al.*, 1996). Расположение и перемещение молекул CTLA-4 – очень динамический процесс. В то время как CD28 располагаются, в основном, на поверхности клеток, молекулы CTLA-4 также в большом количестве обнаруживают и во внутриклеточных структурах: эндосомах (Linsley *et al.*, 1996), лизосомах (Iida *et al.*, 2000), аппарате Гольджи (Valk *et al.*, 2006), что обуславливает быстрый транспорт молекул на поверхность Т-лимфоцита во время активации. Механизм транспорта молекулы CTLA-4 изучен не до конца, однако известно, что вновь синтезированная молекула CTLA-4 связывается в аппарате Гольджи с трансмембранным белком TRIM, который помогает рецептору добраться до поверхности клетки (Valk *et al.*, 2006). Было показано, что у человека и мышей

максимальный уровень экспрессии CTLA-4 достигается через 48 ч от начала стимуляции и снижается до базового уровня через 96 ч (Linsley *et al.*, 1992; Walunas *et al.*, 1994). Интересно отметить, что экспрессия молекулы CTLA-4 зависит от сигнала через рецептор CD28, так антитела против CD28 ускоряют достижение максимального уровня экспрессии мРНК, кодирующей CTLA-4 (Lindsten *et al.*, 1993). Т-лимфоциты, полученные от нокаутных мышей, лишенных CD28, показывают очень низкий уровень экспрессии CTLA-4 на клеточной поверхности, который может быть восстановлен с помощью экзогенного IL-2 (Walunas *et al.*, 1994), эти результаты говорят о том, что CD28 регулирует экспрессию CTLA-4, возможно, через усиление продукции IL-2.

Учитывая способность рецепторов CD28 и CTLA-4 регулировать иммунный ответ, исследователи начали использовать их в качестве мишеней для терапии. Так, было показано, что трансфекция опухолевых клеток плазмидами, кодирующими лиганды B7, приводит к отторжению трансплантируемых мышинных опухолей (Chen *et al.*, 1992). Позднее на животных моделях было показано, что инъекция антител против CTLA-4 также приводит к регрессии опухолей (Leach, Krummel and Allison, 1996). Более того, блокада сигнала через рецептор CTLA-4 с помощью специфических антител усиливает проявление аутоиммунных заболеваний у мышей (Karandikar *et al.*, 1996). Напротив, инъекция химерного рекомбинантного белка CTLA4-Ig, который блокирует взаимодействие B7-1 и B7-2 с костимулирующим рецептором CD28, приводит к снижению аутоиммунного и аллогенного ответа *in vivo* (Via *et al.*, 1996; Finck, Linsley and Wofsy, 1994).

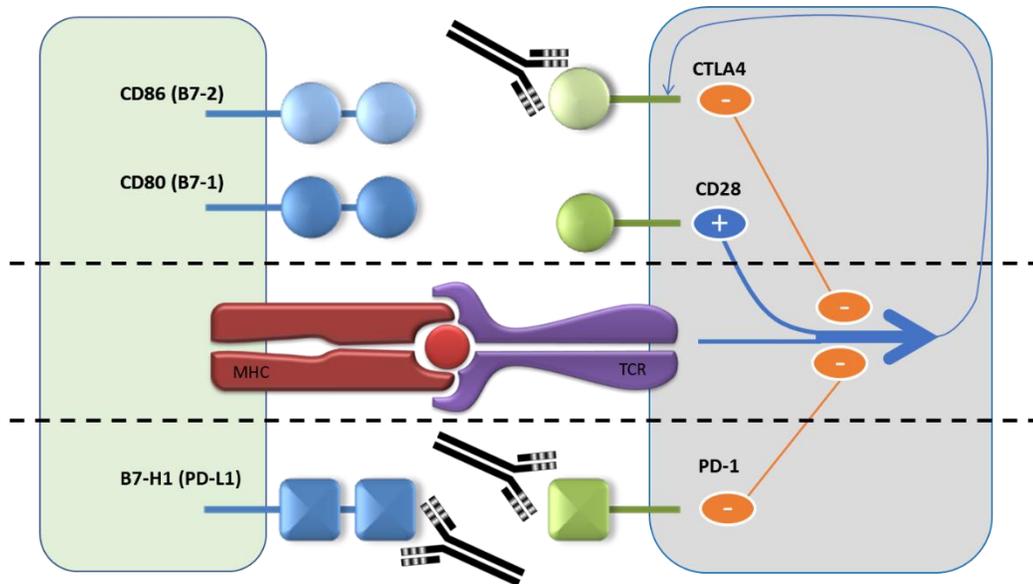


Рисунок 3. Блокада ингибирующих сигналов с помощью МАТ. Моноклональные антитела блокируют взаимодействие ингибирующих рецепторов (CTLA-4 или PD-1) со специфическими лигандами (B7-1, B7-2 или PD-L1)

Успешные результаты экспериментов на мышиных моделях вызвали огромный интерес к исследованиям функциональных свойств молекул семейства B7 и их применению в качестве мишеней для терапевтического воздействия, в том числе путем блокирования взаимодействия лигандов со своими специфическими рецепторами (рис. 3). Клиническое применение гуманизированного анти-CTLA-4 антитела, Ипилимумаба (ipilimumab, Yervoy), было разрешено Управлением по пище и лекарствам США (Food & Drug Administration, FDA) для лечения прогрессирующей меланомы и других онкологических заболеваний. Терапевтическое применение антител против CTLA-4 подробно описано в ряде обзоров (Seidel, Otsuka and Kabashima, 2018), однако следует отметить, что механизмы терапевтического действия анти-CTLA-4 МАТ до сих пор остаются неисследованными. Было предположено, что Ипилимумаб обладает не только CTLA-4-блокирующим эффектом, но и цитолитической активностью против регуляторных Т-клеток (Treg), которые

подавляют иммунный ответ (Tang *et al.*, 2018). Тем не менее, недавно опубликованные результаты говорят о том, что после терапии Ипилимумабом количество клеток Treg остается таким же, как и до терапии (Sharma *et al.*, 2018). Таким образом, вопрос о том, является ли CTLA-4-блокирующий эффект Ипилимумаба основным противоопухолевым механизмом, требует дополнительных экспериментов.

1.5 B7-H1/B7-DC/PD-1

Идентификация рецептора PD-1 и его лигандов B7-H1 и B7-DC

Рецептор PD-1 (англ. Programmed cell Death 1, CD279), обнаруженный в 1992 году, как было показано, играет определенную роль в регуляции апоптоза Т-лимфоцитов (Ishida *et al.*, 1992). Внеклеточная часть PD-1 содержит один IgV домен, цитоплазматическая часть содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (англ. immuno receptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM), что говорит о возможной ингибирующей роли PD-1 в регуляции иммунного ответа. PD-1 имеет 23 % гомологии с CTLA-4, что позволило предположить, что лиганды рецептора PD-1 похожи на B7-1 и B7-2 (Freeman *et al.*, 2000). Действительно, последовательность ДНК, предположительно кодирующая лиганд рецептора PD-1, названный B7-H1, была найдена в геномных базах данных с помощью поиска последовательностей, гомологичных B7-1 и B7-2 (Dong *et al.*, 1999). Позднее был обнаружен еще один лиганд, взаимодействующий с PD-1 – B7-DC (альтернативные названия PD-L2, CD273), этот лиганд также был найден с помощью поиска гомологичных последовательностей в базах данных (Tseng *et al.*, 2001; Latchman *et al.*, 2001).

Оба лиганда В7-Н1 (PD-L1, CD274) и В7-DC (PD-L2, CD273) относятся к I-му типу трансмембранных белков и содержат сигнальную последовательность, IgV домен, IgC домен, трансмембранный домен и внутриклеточную часть. Лиганды В7-Н1 (PD-L1, CD274) и В7-DC (PD-L2, CD273) обладают ингибирующим действием при связывании с рецептором PD-1, их взаимодействие препятствует преждевременной смерти клетки, снижает активацию Т-лимфоцитов и ингибирует их цитотоксическую активность (Wang *et al.*, 2003).

Экспрессия В7-Н1/В7-DC и PD-1

В первых публикациях, описывающих рецептор PD-1, был отмечен его высокий уровень продукции в тимусе, в котором происходит массивный апоптоз Т-лимфоцитов (Ishida *et al.*, 1992). Позднее в Т-, В-клетках, НК и миелоидных клетках был обнаружен низкий уровень мРНК, кодирующей PD-1, который значительно увеличивался после активации этих клеточных популяций (Agata *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 2002). Наличие PD-1 на разных клетках иммунной системы говорит о том, что в отличие от CD28 и CTLA-4, PD-1 может регулировать функциональную активность не только Т-лимфоцитов, но и В-клеток, НК, а также миелоидных клеток.

Матричная РНК, кодирующая В7-Н1, обнаружена в лимфоидных тканях, таких как тимус, костный мозг, селезенка и лимфоузлы, а также в нелимфоидных тканях: сердце, мышцы, плацента, легкие, почки и печень (Dong *et al.*, 1999). Белок В7-Н1 конститутивно экспрессируется на поверхности АПК (макрофаги и дендритные клетки), кроме того, было показано, что интерферон γ может индуцировать экспрессию В7-Н1 на поверхности эпителиальных и эндотелиальных клеток (Mazanet and Hughes, 2002).

B7-DC обычно представлен только на поверхности активированных макрофагов и ДК, его экспрессия может быть увеличена стимуляцией различными цитокинами: IFN- γ , GM-CSF, IL-3 и IL-4 (Yamazaki *et al.*, 2002). Различия в экспрессии двух лигандов рецептора PD-1 предполагают разные механизмы, вовлеченные в ее регуляцию. В самом деле, было показано, что уровень экспрессии B7-H1 на макрофагах зависит от TLR4 и STAT1, в то время как экспрессия B7-DC регулируется через IL-4R α и STAT6. Вероятно, что экспрессия B7-H1 и B7-DC регулируются в условиях Th1 и Th2 иммунных ответа по-разному (Loke and Allison, 2003).

Следует особенно отметить особенности экспрессии рецептора PD-1 и его лигандов B7-H1 и B7-DC, а также их взаимодействие в опухолях. Было показано, что PD-1 экспрессируется на лимфоцитах, инфильтрирующих различные опухоли (Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Muenst *et al.*, 2013). Увеличенная экспрессия PD-1 на CD8⁺ Т-лимфоцитах, инфильтрирующих опухоли, приводит к снижению функциональной активности клеток, в частности, к снижению продукции цитокинов (Ahmadzadeh *et al.*, 2009). При увеличении экспрессии рецептора PD-1 на Т-лимфоцитах, инфильтрирующих опухоли, соответственно увеличивается и экспрессия B7-H1 и B7-DC на поверхности многих злокачественных клеток человека различной гистологии и анатомического расположения (Zou and Chen, 2008; Kluger *et al.*, 2015). Более того, в некоторых случаях экспрессия B7-H1 ассоциирована с более поздней стадией рака и повышением смертности пациентов (Zhou *et al.*, 2017; Tokito *et al.*, 2016). Трансфекция B7-H1 в мышечные опухолевые клетки значительно снижает местный противоопухолевый Т-клеточный иммунный ответ (Dong *et al.*, 1999; Konishi *et al.*, 2004). Эти наблюдения положили основу для использования блокады взаимодействия PD-1/B7-H1 для усиления функции противоопухолевых эффекторов непосредственно внутри опухоли.

Экспрессия В7-DC была обнаружена на клетках В-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина, рака пищевода (Shi *et al.*, 2014; Rosenwald *et al.*, 2003).

Функциональная активность В7-Н1/В7-DC и PD-1

Как было показано, рецептор PD-1 сдерживает активацию Т-лимфоцитов в периферических тканях во время воспаления в ответ на инфекции и подавляет аутоиммунные реакции. У мышей, нокаутных по PD-1, наблюдаются различные аутоиммунные патологии, в зависимости от инбредной линии: дилатационная кардиомиопатия, прогрессирующая сердечная недостаточность (Nishimura *et al.*, 2001); артрит и системная красная волчанка (Nishimura *et al.*, 1999), раннее развитие диабета 1-го типа (Wang *et al.*, 2005a). Как было показано, ингибирование иммунного ответа *in vivo* происходит через взаимодействие PD-1 с В7-Н1, но не В7-DC, вероятно из-за того, что в периферических тканях в основном экспрессируется В7-Н1 (Tsushima *et al.*, 2003; Ansari *et al.*, 2003).

Необходимо отметить определенное расхождение в опубликованных результатах о роли лигандов PD-1, В7-Н1 и В7-DC в регуляции активации Т-лимфоцитов. Было показано, что химерные рекомбинантные белки В7-Н1Ig и В7-DCIg, полученные в разных лабораториях, могут как стимулировать (Dong *et al.*, 1999), так и снижать (Latchman *et al.*, 2001) пролиферацию Т-клеток. Аналогичное расхождение результатов в разных лабораториях было получено и при использовании антител, блокирующих В7-Н1 или В7-DC. Антитела вызывали как стимуляцию иммунного ответа (Shin *et al.*, 2005), так и его снижение (Salama *et al.*, 2003). Подобный парадокс наблюдается в экспериментах *in vivo*. Было показано, что нокаут гена В7-Н1 у NOD мышей (В7-Н1 экспрессируется на клетках островков Лангерганса в поджелудочной железе мышей) приводит к быстрому развитию диабета (Keir *et al.*, 2006). Однако совершенно противоположные выводы были сделаны при

использовании другой модели: у трансгенных мышей экспрессия В7-Н1 на бета-клетках приводила к развитию аутоиммунного диабета (Subudhi *et al.*, 2004).

Объяснить противоречивые результаты функциональной активности В7-Н1 и В7-DC не просто. Была предложена гипотеза, существования наряду с PD-1 еще одного, пока неизвестного, рецептора, взаимодействующего с лигандами В7-Н1 и В7-DC и вызывающего активацию Т-лимфоцитов, подобно тому, как это происходит в комплексе В7-1/В7-2:CD28/CTLA-4 (Kanai *et al.*, 2003). В самом деле, было показано, что мутантные формы В7-Н1 и В7-DC, которые не связываются с PD-1, способны стимулировать Т-лимфоциты как нормальных, так и PD-1-нокаутных мышей, что подтверждает стимулирующую функцию В7-Н1 и В7-DC (Wang *et al.*, 2003).

Эффекты антител, используемых для блокировки В7-Н1 и В7-DC, зависят от генотипа и фенотипа инбредных линий мышей, что объясняет противоречивые результаты. Для решения парадокса В7-Н1/В7-DC требуются дополнительные эксперименты с использованием, прежде всего, мышей с одинаковым генотипом.

Недавно было обнаружено, что лиганд В7-Н1 также связывается с В7-1 молекулой (лиганд CD28 и CTLA-4 рецепторов), которая может экспрессироваться на поверхности Т-лимфоцитов и выступает в качестве ингибирующего рецептора, что подчеркивает сложность функциональных взаимодействий между молекулами семейства В7 (Butte *et al.*, 2007). Экспрессия молекул В7-1 на поверхности активированных Т-лимфоцитов снижает Т-клеточный ответ *in vitro* и регулирует Т-клеточную толерантность *in vivo* (Butte *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010). Важно отметить, что взаимодействие В7-1, Treg с В7-Н1 на АПК играет важную роль в пролиферации регуляторных Т-лимфоцитов во время воспаления при реакции на трансплантат у мышей (Yi *et al.*, 2011). Наличие двух лигандов (В7-Н1 и В7-DC) для PD-1 и двух

ингибирующих рецепторов (PD-1 и B7-1) для B7-H1 позволяет предположить, что функциональные и терапевтические эффекты блокады B7-H1 или PD-1 могут быть различными. Так, блокада PD-1 с помощью МАТ будет ингибировать сигнал через PD-1, но B7-H1/B7-1-сигнальный путь по-прежнему будет активным. При блокаде B7-H1 с помощью МАТ будут нарушены взаимодействия B7-H1/PD1 и B7-H1/B7-1, в то время как взаимодействие B7-DC/PD-1 останется интактным. Таким образом, полная блокада ингибирования иммунного ответа B7-H1/PD-1 требует комбинированной и специфической блокады обеих молекул PD-1 и B7-H1 (рис. 4).

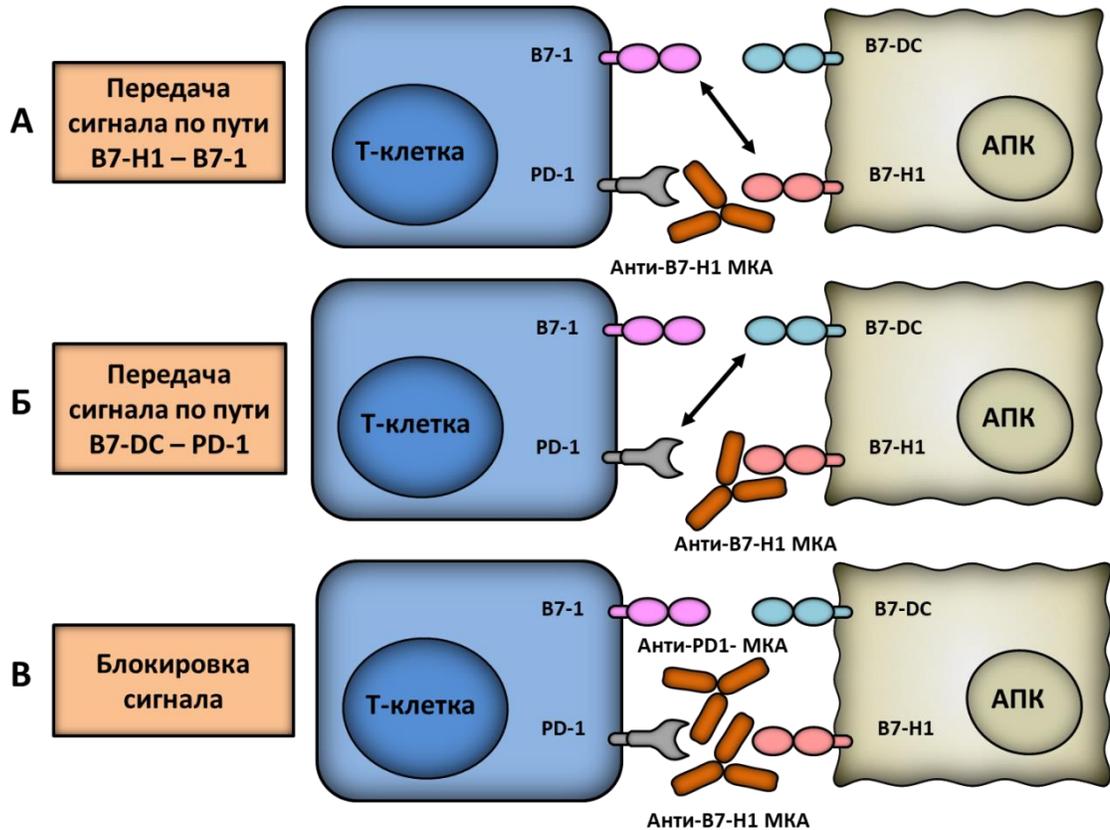


Рисунок 4. Блокировка сигнала в системе PD-1/B7-1 – B7-DC/B7-H1.

(А) Блокада PD-1 с помощью моноклональных антител способна блокировать сигнал через PD-1, но сигнальный путь B7-H1/B7-1 потенциально активен. (Б) Моноклональные антитела против B7-H1 блокируют взаимодействие B7-H1/PD1 и B7-H1/B7-1, однако путь B7-DC/PD-1 активен. (В) Полная блокада ингибирования иммунного ответа

B7-H1/PD-1 требует комбинированной и специфической блокады обеих молекул PD-1 и B7-H1.

Терапевтическое использование B7-H1/B7-DC и PD-1

На основании данных о функциональной активности молекул B7-H1/B7-DC/PD-1 и способности реагентов, блокирующих эти молекулы, стимулировать иммунный ответ, было предложено их использование в качестве мишеней для иммунотерапии онкологических заболеваний. На основании результатов удачных клинических испытаний в 2014 году в США было разрешено клиническое использование антител против PD-1 под названием Пембролизумаб (pembrolizumab, Keytruda, MK-3475, lambrolizumab) и Ниволумаб (nivolumab, Opdivo) для терапии меланомы, рака легкого, рака головы и шеи. В настоящее время проходят клинические испытания и одобрены еще девять биологических препаратов: МАТ: Ниволумаб (nivolumab) против PD-1 и Атезолизумаб (atezolizumab) против B7-H1. Еще два МАТ (pidilizumab и PDR001) против PD-1, три МАТ (BMS-936559, durvalumab и avelumab) против B7-H1 и две химерные молекулы B7-DCIg (AMP-224, AMP-514) исследуются на терапевтическую активность на пациентах с различными формами онкологических заболеваний и для лечения гепатита С (Iwai *et al.*, 2017).

Терапия антителами против B7-H1 (PD-L1) приводит к регрессии меланомы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого и рака мочевого пузыря (Brahmer *et al.*, 2012; Powles *et al.*, 2014). Аналогичные результаты получены в I фазе клинических испытаний анти-PD-1 МАТ (MK-3475, Ипилимаб) (Topalian *et al.*, 2014). Клинические испытания показали, что ~38 % пациентов с меланомой отвечают на терапию с пембролизумабом (Hamid *et al.*, 2013), так же как 26 % пациентов с прогрессирующей меланомой, резистентной к Ипулимумабу (Robert *et al.*, 2014). В III фазе клинических испытаний другое

антитело против PD-1, Ниволумаб (nivolumab), также показало положительный клинический ответ у пациентов с метастатической меланомой. В этих испытаниях объективный клинический ответ наблюдался у 40 % и выживаемость увеличивалась у 72,9 % пациентов, получавших инъекции ниволумаб, по сравнению с 13,9 % объективного ответа и 42,1 % выживаемости у пациентов, получавших дакарбазиновую терапию (Robert *et al.*, 2015). Разрешение на клиническое использование ниволумаб для терапии пациентов с метастатической меланомой было получено в сентябре 2014 года. В марте 2015 года ниволумаб разрешили использовать для терапии метастатического немелкоклеточного рака легкого, на основании результатов III фазы клинических испытаний, где пациенты, получавшие инъекции Ниволумаба, показали увеличение выживаемости по сравнению с пациентами, получавшими терапию с доцетакселом (Borghaei *et al.*, 2015).

При терапии онкологических заболеваний результаты блокады сигнальных путей B7-H1/B7-DC/PD-1 и B7-1/B7-2/CTLA4 различны. Как было сказано выше, B7-H1 и PD-1 в основном регулируют эффекторные функции Т-лимфоцитов внутри опухоли, где, как правило, экспрессируется B7-H1 (Taube *et al.*, 2012), в то время как антитела против CTLA-4 регулируют стимуляцию Т-лимфоцитов в лимфоидных органах, где происходит взаимодействие между B7-1/B7-2 и CTLA-4. Это обстоятельство говорит в пользу того, что для эффективной иммунотерапии онкологических заболеваний, необходимо использовать комбинацию костимуляторных молекул. Действительно, было показано, что комбинация Ниволумаба (анти-PD-1 МАТ) и Ипилимумаба (анти-CTLA-4 МАТ) приводит к объективному клиническому ответу в 53 % случаев (Wolchok *et al.*, 2013). Дальнейшие клинические испытания показали объективный клинический ответ на комбинацию двух МАТ у 61 % пациентов в сравнении с 11 % при монотерапии с Ипилимумабом (Postow *et al.*, 2015). В настоящее время изучаются возможности комбинирования блокады

сигнального пути В7-Н1/В7-DC/PD-1 с манипуляцией другими костимуляторными молекулами. Однако следует отметить, что любые манипуляции функциональной активности костимулирующими молекулами могут приводить к развитию побочных эффектов, таких как аутоиммунные заболевания; этот вопрос подробно рассмотрен в обзоре Боголюбовой с соавторами (Боголюбова *et al.*, 2015).

Говоря о комбинированной иммунотерапии, необходимо также отметить возможность комбинации блокады В7-Н1/В7-DC/PD-1 с химиотерапией. Было показано, что деацетилаза гистонов, применяемая для химиотерапии рака, в комплексе с блокаторами CTLA4 или PD-1, снижают размеры первичных опухолей и метастазов у мышей (Kim *et al.*, 2014).

1.6 В7-Н2/ICOS

Идентификация ICOS и В7-Н2

Еще один стимулирующий рецептор ICOS (Inducible CO-Stimulator) был обнаружен с помощью МАТ против активированных Т-лимфоцитов человека, при поисках маркера активированных Т-клеток (Hutloff *et al.*, 1999). ICOS, выделенный из активированных Т-клеток человека, представляет собой гликозилированный гомодимер с дисульфидными связями, с молекулярной массой 55–60 кД (Beier *et al.*, 2000). Мышиный аналог имеет схожие характеристики (Mages *et al.*, 2000). Ген, кодирующий ICOS, находится в непосредственной близости от генов, кодирующих CD28 и CTLA-4, на 2q33 хромосоме человека и на 1 хромосоме мыши (Mages *et al.*, 2000; Coyle *et al.*, 2000). У человека все три гена организуют кластер в следующем порядке: CD28-CTLA-4-ICOS протяженностью 300 тыс. п.н. (Ling *et al.*, 2001a), это позволяет предположить, что гены произошли путем дупликации одного гена.

Такое близкое расположение генов также дает возможность предполагать координированную регуляцию их экспрессии, возможно через реорганизацию хроматина, которая может влиять на весь кластер, как это наблюдается в кластере генов, кодирующих цитокины (Agarwal and Rao, 1998).

Лиганд ICOS – B7-H2 (синонимы ICOS-L, B7h, GL50, B7RP-1, LICOS, KIAA0653) был обнаружен несколькими исследовательскими группами одновременно с помощью функциональных тестов с использованием молекулы, гомологичной B7-1 и B7-2, которая взаимодействует с ICOS и оказывает костимулирующее действие на Т-лимфоциты (Mages *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2000; Yoshinaga *et al.*, 1999; Swallow, Wallin and Sha, 1999; Wang *et al.*, 2000; Brodie *et al.*, 2000). Ген, кодирующий B7-H2, расположен на 21 хромосоме человека и на 10 хромосоме мыши (Hattori *et al.*, 2000). Таким образом, в отличие от генов, кодирующих рецепторы CD28/CTLA-4/ICOS, объединенных в общий кластер, ген B7-H2 расположен отдельно от генов B7-1 и B7-2, находящихся на 3q13.3-21 и 16 хромосоме человека и мыши, соответственно (Reeves *et al.*, 1997). Интересно отметить, что разными группами были обнаружены две изоформы B7-H2, которые происходят из-за альтернативного сплайсинга (Ling *et al.*, 2001b).

Экспрессия ICOS и B7-H2

ICOS обнаружен на поверхности активированных, но не покоящихся Т-лимфоцитов (Hutloff *et al.*, 1999); это говорит о том, что ICOS может костимулировать активированные Т-клетки. Экспрессия ICOS требует сигналов через TCR и рецептор CD28 (McAdam *et al.*, 2000). Однако экспрессия ICOS не находится в абсолютной зависимости от CD28. Так, CD8⁺ Т-лимфоциты человека, на которых не обнаружена CD28 молекула, экспрессируют ICOS (Hutloff *et al.*, 1999). Также было обнаружено, что ICOSIg снижает Т-клеточный

ответ у иммунодефицитных, CD28-нокаутных мышей (Kopf *et al.*, 2000). Во время активации уровень экспрессии ICOS увеличивается как на Th1, так и на Th2 лимфоцитах, но на Th2 клетках уровень экспрессии остается высоким более длительное время, что говорит о наличии неисследованных механизмов стабилизации ICOS (Coyle *et al.*, 2000; McAdam *et al.*, 2000). ICOS также экспрессируется на мышинных тимоцитах (Mages *et al.*, 2000) и на активированных В-клетках крысы (Tezuka *et al.*, 2000). Было обнаружено, что регуляторные Т-клетки (Treg: regulatory T-cells), положительные по Foxp-3, имеют высокий уровень конститутивной экспрессии ICOS, что предполагает участие ICOS в функциональной активности Treg (Gotsman *et al.*, 2006).

B7-H2 конститутивно экспрессируется на В-клетках, макрофагах, и его экспрессия может быть индуцирована на нелимфоидных клетках под воздействием воспалительных стимулов (Swallow, Wallin and Sha, 1999; Yoshinaga *et al.*, 1999). Как и другие молекулы семейства B7, B7-H2 был обнаружен на поверхности активированных Т-лимфоцитов (Ling *et al.*, 2000). TNF- α индуцирует, а IFN- γ ингибирует синтез мРНК B7-H2 в 3Т3 клетках и фибробластах (Swallow, Wallin and Sha, 1999). У мышей инъекция липополисахарида (ЛПС) индуцирует синтез мРНК B7-H2 в нелимфоидных тканях; напротив, в селезенке экспрессия B7-H2 после введения ЛПС снижается (Swallow, Wallin and Sha, 1999). Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия B7-H2 может увеличиваться в месте воспаления. Функциональная роль экспрессии B7-H2 на клетках периферических тканей требует дальнейшего изучения.

Функции ICOS и B7-H2

В начальных экспериментах было показано, что костимулирующие сигналы через ICOS усиливают пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов, но не

увеличивают продукцию IL-2 (Hutloff *et al.*, 1999). В дополнение ICOS увеличивает продукцию различных цитокинов, таких как IFN- γ , TNF α (Th1), IL-4, IL-5, IL-10 (Th2) (Hutloff *et al.*, 1999; McAdam *et al.*, 2000; Coyle *et al.*, 2000). С использованием мышей, нокаутных по ICOS или B7-H2, была показана критическая роль ICOS в иммунном и аутоиммунном ответе (Nurieva *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2001; McAdam *et al.*, 2001; Tafuri *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2003). Интересно отметить, что Т-лимфоциты, полученные от мышей, нокаутных по ICOS, показали сниженную продукцию IL-4 (Th2-цитокинов), но были способны продуцировать нормальное количество IL-5 (Dong *et al.*, 2001).

В экспериментах *in vivo* было показано, что ICOS играет важную роль в регуляции гуморального иммунного ответа, а именно в формировании герминативного центра лимфоузлов и переключении классов иммуноглобулинов (Nurieva *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2001; Tafuri *et al.*, 2001; Dong, Temann and Flavell, 2001). Было обнаружено, что ICOS экспрессируется на CXCR5+ фолликулярных Т-лимфоцитах, присутствующих в апикальной светлой зоне герминативного центра, обеспечивающих продукцию иммуноглобулинов (Breitfeld *et al.*, 2000; Schaerli *et al.*, 2000). Отсутствие ICOS у человека или мышей приводит к снижению количества фолликулярных Т-лимфоцитов, что говорит о важности ICOS в дифференциации этих клеток (Akiba *et al.*, 2005; Bossaller *et al.*, 2006).

Терапевтическое использование ICOS и B7-H2

Как следует из вышеизложенных фактов, ICOS может регулировать развитие аутоиммунных заболеваний, в патогенезе которых участвуют Th2 лимфоциты, регулирующие гуморальный иммунный ответ. Блокирование ICOS в мышинных моделях аутоиммунных заболеваний показало, что этот механизм костимуляции требуется для активации Т-лимфоцитов при патогенезе

экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) и развития диабета 1-го типа у NOD мышей (Ansari *et al.*, 2008; Rottman *et al.*, 2001).

В моделях трансплантации было показано, что сигнал через ICOS приводит к развитию и острого, и хронического отторжения трансплантата (Ozkaunak *et al.*, 2001; Nanji *et al.*, 2006). Использование CTLA-4Ig в комбинации с блокадой ICOS давало синергический эффект в улучшении приживаемости трансплантата (Schenk *et al.*, 2009).

Блокада рецептора ICOS или нокаут гена, кодирующего ICOS, снижает продукцию иммуноглобулинов и цитокинов во время первичного иммунного ответа против вируса везикулярного стоматита, лимфатического хориоменингита и вируса гриппа А (Bertram *et al.*, 2002). Также блокировка ICOS с помощью МАТ снижает иммунный ответ, обусловленный хелперными CD4⁺ Т-клетками при ВИЧ-1 инфекции (Zhou *et al.*, 2004). Снижение гуморального иммунного ответа и продукция цитокинов после блокады ICOS особенно выражена у мышей, лишенных другого важного костимуляторного рецептора CD28 (Suh *et al.*, 2004). Это говорит о том, что костимуляторные молекулы участвуют в регуляции иммунного ответа совместно; для понимания вклада каждой корегуляторной молекулы требуется разработка инструментов для изучения их индивидуальной функциональной активности.

Показано, что CD28 и ICOS играют уникальную роль в регуляции аллергии и астмы. Результаты, полученные с помощью экспериментальных моделей, говорят о том, что рецептор CD28 важен для активации первичного ответа и дифференциации Th1 CD4⁺ Т-клеток, в то время как ICOS играет ключевую роль в регуляции Th2 иммунного ответа при аллергии и астме (Coyle and Gutierrez-Ramos, 2004).

Значительное снижение IgG, но не IgM против гемоцианина морского моллюска (KLH, от англ. keyhole limpet haemocyanin) наблюдалось у пациентов с системной красной волчанкой, получавших инъекции AMG 557 (МАТ против

B7-H2) совместно с KLN (Sullivan *et al.*, 2016). Это говорит о том, что блокада взаимодействия B7-H2 с ICOS может быть использована в качестве терапии аутоиммунных заболеваний.

Блокада CD28 и ICOS, но не CTLA4, предотвращает отторжение трансплантатов более эффективно, чем блокада CD28 или ICOS поодиночке (Li *et al.*, 2011). Вероятно, для достижения успеха в разработке терапевтических стратегий на основе блокады ICOS или других костимуляторных молекул необходимо рассматривать использование комбинированных вариантов.

1.7 B7-H3

Идентификация B7-H3

Так как лиганд B7-H3 был впервые обнаружен автором данной диссертации и является одним из объектов исследования настоящей диссертации, обнаружение лиганда B7-H3 и изучение некоторых его функций будет описано в разделе «Результаты». Другими исследователями было показано, что B7-H3 ген расположен на 15 хромосоме человека и кодирует сигнальный пептид, IgV и IgC домены, гидрофобный трансмембранный регион и цитоплазматическую часть. Мышиный ген B7-H3 расположен на 9-ой хромосоме и имеет 88 % идентичности и 93 % гомологии с человеческой молекулой (Sun *et al.*, 2002). Мышиная молекула содержит два иммуноглобулиновых домена (IgV-IgC), у человека есть дополнительная изоформа B7-H3, названная 4Ig-B7-H3, которая содержит практически идентичный второй IgV-IgC тандем, произошедший в результате дупликации экзонов (Sun *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2003; Steinberger *et al.*, 2004). В эволюционном плане лиганд B7-H3 – один из наиболее консервативных членов

семейства V7, который обнаружен у различных видов животных от костистых рыб до млекопитающих V7-НЗ (Sun *et al.*, 2011).

Экспрессия V7-НЗ

Было показано, что мРНК, кодирующая V7-НЗ, обнаруживается в различных тканях, включая сердце, печень, плаценту, предстательную железу, яичник, поджелудочную железу и кишечник (Charoval *et al.*, 2001). Экспрессия белка ограничена и обычно обнаруживается в малых количествах. Так, белок V7-НЗ не экспрессируется на покоящихся Т-лимфоцитах, НК-клетках, ДК или макрофагах, однако после активации V7-НЗ может быть обнаружен на поверхности этих клеток (Steinberger *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2003). Разница в уровне синтеза мРНК и белка подразумевает наличие сложных механизмов посттранскрипционной регуляции экспрессии. Возможно, что в регуляции экспрессии V7-НЗ принимает участие микроРНК miR-29, так как было показано, что уровень экспрессии V7-НЗ обратно пропорционален уровню miR-29 (Xu *et al.*, 2009). Однако точные механизмы, регулирующие экспрессию V7-НЗ, в настоящее время не известны. Наличие V7-НЗ было описано для раковых клеток меланомы (Wang *et al.*, 2013b), глиомы (Zhou *et al.*, 2013), легких (Xu *et al.*, 2010), поджелудочной железы (Yamato *et al.*, 2009), почек (Crispen *et al.*, 2008), кишечника (Ingebrigtsen *et al.*, 2014), яичника (Zang *et al.*, 2010), молочной железы (Arigami *et al.*, 2010), желудка (Wu *et al.*, 2006). Для некоторых опухолей была показана корреляция между экспрессией V7-НЗ и клинико-патологическими параметрами опухолей. Однако молекулярные механизмы, регулирующие экспрессию и функцию V7-НЗ на опухолевых клетках, остаются неизученными.

В 2008 году появилось сообщение о том, что TLT-2, член семейства молекул TREM (triggering receptor expressed on myeloid cells), является

рецептором для лиганда В7-Н3 (Hashiguchi *et al.*, 2008). Взаимодействие В7-Н3 с TLT-2 усиливает продукцию IFN- γ , что соответствует результатам, полученным в наших исследованиях. Однако год спустя после публикации сообщения о возможной роли TLT-2 как рецептора В7-Н3 была опубликована статья, где сообщается, что В7-Н3 не взаимодействует с TLT-2 (Leitner *et al.*, 2009). Позднее независимая группа подтвердила, что В7-Н3 не связывается с клетками, трансфицированными конструкцией, обеспечивающей экспрессию TLT-2, но взаимодействует с активированными Т-лимфоцитами (Yan *et al.*, 2013). Таким образом, рецептор лиганда В7-Н3 в настоящее время не обнаружен.

Функция В7-Н3

Было показано, что В7-Н3 увеличивает пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и продукцию IFN- γ в присутствии анти-CD3 МАТ, используемых в качестве суррогатного антигенного сигнала через TCR (см. РЕЗУЛЬТАТЫ). Данные из других лабораторий указывают на то, что обе изоформы В7-Н3 человека (IgV-IgC и IgV-IgC-IgV-IgC) ингибируют пролиферацию CD4⁺ Т-клеток и снижают продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию через TCR (Ling *et al.*, 2003). С тех пор опубликовано более 260 статей, где сообщается как об активирующих, так и о ингибирующих свойствах этой молекулы.

В следующих публикациях было показано, что В7-Н3 стимулирует Т-лимфоциты *in vitro* (Hashiguchi *et al.*, 2008; Kobori *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2004). Результаты других статей свидетельствуют о том, что В7-Н3 ингибирует Т-лимфоциты *in vitro* (Suh *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2004; Leitner *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Vigdorovich *et al.*, 2013). Есть также работа, согласно результатам которой В7-Н3 не имеет никакого эффекта на функциональную активность Т-лимфоцитов (Steinberger *et al.*, 2004).

Иммуномодулирующие свойства В7-Н3 могут зависеть от наличия других корегуляторных сигналов: так, было показано, что в системе *in vitro* В7-Н3 стимулирует ответ Т-лимфоцитов только в присутствии CD28 сигнала (Nagashima *et al.*, 2008).

Результаты экспериментов *in vivo* также подтверждают существующий парадокс и противоречие в функциональной активности В7-Н3 (Wang *et al.*, 2005b). Введение плазмиды, кодирующей В7-Н3, в сформировавшиеся подкожные опухоли EL-4 приводит к регрессии 50 % опухолей CD8+ Т-лимфоцитами и NK-клетками (Sun *et al.*, 2003), пролиферации Т-лимфоцитов и продукции IFN- γ (Yang *et al.*, 2008). Было также показано, что В7-Н3 может обуславливать усиление симптомов и патогенеза пневмококкового менингита через усиление продукции провоспалительных цитокинов, макрофагами и моноцитами (Chen *et al.*, 2012). Наоборот, элиминация или блокировка В7-Н3 приводила к обратному эффекту: у мышей, нокаутных по гену В7-Н3, было замечено увеличение размера спонтанных опухолей (Kreymborg *et al.*, 2015) и снижение воспалительных реакций (Luo *et al.*, 2015). Введение анти-В7-Н3 МАТ снижало симптомы экспериментальной астмы у мышей (Chen *et al.*, 2013), вызывало снижение продукции TNF- α и IL-6 в ответ на ЛПС и увеличивало выживаемость при эндотоксиновом шоке (Zhang *et al.*, 2010) Также обострение астмы у детей сопровождается значительным увеличением экспрессии В7-Н3 и продукцией цитокинов IFN- γ , IL-4, IL-10 (Chen *et al.*, 2015b). Эти результаты свидетельствуют о том, что В7-Н3 может усиливать отторжение трансплантата, аутоиммунные заболевания, воспалительные реакции, аллергию и противоопухолевый иммунитет.

Таким образом, различные исследовательские группы, используя похожие экспериментальные системы, получают противоречивые результаты о функциональной активности В7-Н3.

Публикации о клинической роли В7-Н3 в патогенезе онкологических заболеваний также свидетельствуют как о стимулирующей, так и о ингибирующей роли В7-Н3. Время жизни без рецидива было дольше у пациентов с острым миелоидным лейкозом, клетки которых экспрессируют В7-Н3 (Guery *et al.*, 2015). Было также показано, что экспрессия В7-Н3 на клетках рака поджелудочной железы значительно коррелировала с увеличенной выживаемостью пациентов (Loos *et al.*, 2009).

Экспрессия В7-Н3 на клетках миелоидного лейкоза имеет статистически значимую корреляцию с прогрессией заболевания и снижением выживаемости (Hu *et al.*, 2015). Пациенты с плоскоклеточной карциномой пищевода, опухоли которых экспрессировали высокие уровни В7-Н3 и В7-Н4, показали сниженную выживаемости (26.7 месяцев), в то время как выживаемость пациентов, чьи опухоли экспрессируют низкие уровни В7-Н3, была лучше (56.7 месяцев) (Wang *et al.*, 2015). Экспрессия ILT4 и В7-Н3 на опухолях немелкоклеточного рака легкого коррелировала со снижением выживаемости (Zhang *et al.*, 2015a). Повышенная экспрессия В7-Н3 на клетках плоскоклеточной карциномы ротовой полости также ассоциируется с плохим прогнозом (Chen *et al.*, 2015a). Экспрессия В7-Н3 на клетках рака молочной железы ассоциировалась со снижением времени жизни пациентов без рецидива (Maeda *et al.*, 2014). Все эти публикации свидетельствуют о том, что увеличенная экспрессия В7-Н3 может обуславливать патогенез различных онкологических заболеваний.

Было показано, что В7-Н3 нокаутные опухоли растут медленнее у иммунодефицитных мышей (Balb/c nude), что говорит о существовании неиммунологических механизмов регуляции роста и патогенеза опухолей, экспрессирующих В7-Н3 (Zhang *et al.*, 2015c; Liu *et al.*, 2011). Среди неиммунологических механизмов регуляции патогенеза онкологических заболеваний, в которых участвует молекула В7-Н3, необходимо отметить ангиогенез и продукцию металлопептидаз (Sun *et al.*, 2014).

Независимо от механизмов участия В7-Н3 в патогенезе опухолей использование терапевтических средств, направленных на модуляцию экспрессии В7-Н3, является перспективным направлением исследований для разработки новых лекарственных средств, лечения онкологических заболеваний.

Терапевтическое использование В7-Н3

В то время как результаты экспериментов *in vitro* и на мышинных моделях заболеваний показывают как стимулирующие, так и ингибирующие свойства В7-Н3, эксперименты с опухолевыми моделями поддерживают костимуляторную роль В7-Н3 в регуляции противоопухолевого иммунитета (Luo *et al.*, 2004), (Sun *et al.*, 2003)(Loos *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006). Большинство исследований, однако, демонстрируют обратную корреляцию между экспрессией В7-Н3 и исходом онкологического заболевания (Zang *et al.*, 2007; Roth *et al.*, 2007). Растворимая форма В7-Н3 может быть фактором блокировки противоопухолевого иммунитета (Sun *et al.*, 2010). Все эти факты обуславливают основное направление в разработке терапевтических средств с использованием В7-Н3. В первую очередь это МАТ, которые могут участвовать в прямом лизисе опухолевых клеток, на которых экспрессируется В7-Н3.

Эноблитузумаб (Enoblituzumab; MGA271) – МАТ, взаимодействующие с В7-Н3 на опухолевых клетках, показали мощную АКЗЦ против широкого спектра опухолевых клеток. У мышей с ксенотрансплантатами клеток рака почек и мочевого пузыря еженедельные инъекции MGA271 приводят к подавлению роста опухолей. Для противоопухолевого эффекта требуется взаимодействие антител с рецептором Fc (Loo *et al.*, 2012). В настоящее время проходит 2 стадия клинических испытаний анти-В7-Н3 МАТ для лечения больных с В7-Н3-экспрессирующими опухолями, рефракторными к другим препаратам. Предварительные результаты исследования различных доз МАТ

показывают, что Эноблитузумаб (анти-B7-H3) имеет противоопухолевую активность для терапии нескольких типов опухолей и модулирует иммунный ответ, что отражается в увеличении разнообразия Т-клеток у больных после лечения (<https://www.macrogenics.com/enoblituzumab-anti-b7-h3/>). Хотя Эноблитузумаб не является блокирующим МАТ, его эффективность во многом зависит от АКЗЦ, и результаты внушают оптимизм для разработки новых стратегий использования В7-Н3 при терапии различных онкологических заболеваний. Использование блокирующего антитела MJ18 на мышинной модели карциномы показало значительную супрессию развития опухоли (Mao *et al.*, 2017). МАТ 8Н9 конъюгированные с ¹³¹I показали хорошее проникновение в клетки ксенотрансплантированной нейробластомы у мышей (Ahmed *et al.*, 2015). В настоящее время с использованием конъюгата на основе антитела 8Н9 идут клинические испытания у пациентов с перитонеальными опухолями, глиомами и другими опухолями центральной нервной системы (NCT01099644, NCT01502917 и NCT00089245).

1.8 В7-Н4

Идентификация В7-Н4 (В7х, В7S1, VTCN1, and DD-0110)

Первые статьи из двух независимых лабораторий, описывающие молекулу В7-Н4 (**В7 Homolog 4**), также известную как В7х, В7S1, VTCN1, были опубликованы в июне 2003 (Sica *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2003). Для того, чтобы найти В7-Н4, обе научные группы использовали аналогичные подходы. Был произведен поиск в базе данных EST (expressed sequence tagged) с использованием нуклеотидных последовательностей IgV и IgC доменов известных молекул семейства В7, позволивший обнаружить короткую нуклеотидную последовательность, гомологичную этим молекулам.

Дальнейший поиск в базе данных с помощью обнаруженной нуклеотидной последовательности помог найти перекрывающиеся фрагменты. После совмещения перекрывающихся фрагментов была сформирована нуклеотидная последовательность, кодирующая весь белок В7-Н4. На основе обнаруженных нуклеотидных последовательностей были подобраны праймеры, и с помощью ПЦР проведена амплификация последовательности, кодирующей молекулу В7-Н4 из кДНК библиотеки, полученной из плаценты человека. Полученная нуклеотидная последовательность кодирует предполагаемый белок длиной в 282 аминокислоты с несколькими вероятными участками гликозилирования на внеклеточном домене. Аминокислотная последовательность человеческой молекулы В7-Н4 имеет большой гидрофобный трансмембранный домен и очень короткий внутриклеточный домен длиной всего в 2 аминокислоты (Sica *et al.*, 2003). Предсказанный В7-Н4 является трансмембранным белком I-го типа. Следует отметить, что эволюционно В7-Н4 является весьма консервативной молекулой, которая имеет 87 % аминокислотной идентичности между человеком и мышью (Prasad *et al.*, 2004). Ввиду короткого внутриклеточного домена В7-Н4 может экспрессироваться на поверхности клетки в соединении с ГФИ-якорем (гликозилфосфатидилинозитол) (Sica *et al.*, 2003). За счет альтернативного сплайсинга 6-го экзона существует две изоформы В7-Н4, полная и укороченная (Choi *et al.*, 2003).

Экспрессия В7-Н4

мРНК, кодирующая В7-Н4, обнаружена в лимфоидных и нелимфоидных тканях, но экспрессия В7-Н4 ограничена в нормальных тканях, что говорит о посттранскрипционной регуляции (Sica *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003). В7-Н4 может экспрессироваться на поверхности клетки, в цитоплазме и в ядре раковых клеток. Локализация В7-Н4 в ядре клетки оказывает влияние на

клеточный цикл и пролиферацию опухолевых клеточных линий через регуляцию циклина D1 и E (Zhang *et al.*, 2013).

Экспрессия В7-Н4 может быть индуцирована на моноцитах, макрофагах и миелоидных ДК под воздействием IL-6 и IL-10, но ингибируется другими цитокинами, такими как GM-CSF и IL-4 (Kryczek *et al.*, 2006b; Kryczek *et al.*, 2006a). В7-Н4 также экспрессируется на клетках рака молочной железы, почек, яичников, поджелудочной железы, мозга и рака легких (Choi *et al.*, 2003; Krambeck *et al.*, 2006; Salceda *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013), увеличенная экспрессия В7-Н4 коррелирует с плохим прогнозом и снижением выживаемости пациентов.

Функция В7-Н4

Эксперименты с использованием В7-Н4 нокаутных мышей, клеток, трансфицированных В7-Н4, и рекомбинантных белков В7-Н4Ig, показывают, что В7-Н4 ингибирует иммунный ответ. Однако у В7-Н4 нокаутных мышей не обнаружено спонтанных аутоиммунных заболеваний или нарушения иммунного гомеостаза (Suh *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009). Тем не менее отсутствие В7-Н4 у мышей увеличивает заболеваемость и тяжесть экспериментального энцефаломиелита и коллаген-индуцированного артрита (КИА). Увеличенная экспрессия В7-Н4 на клетках островков поджелудочной железы снижает иммунную реакцию и увеличивает срок выживания аллотрансплантата у мышей. Аналогичным образом введение В7-Н4Ig задерживает начало развития диабета и КИА у NOD мышей, что связано со снижением количества Th17 клеток и увеличением продукции IFN- γ . Это указывает на то, что В7-Н4 регулирует функциональную активность Th17 клеток. В подтверждение этих выводов у В7-Н4 нокаутных мышей обнаружено усиление Th1 клеточного ответа против *Leishmania* и при аутоиммунных

заболеваниях (Suh *et al.*, 2006). Однако у В7-Н4 нокаутных мышей не обнаружено изменения Th1 ответа при воспалении дыхательных путей, контактной гиперчувствительности или ЦТЛ ответе на острые вирусные инфекции. Это говорит о том, что В7-Н4 не является доминирующей ингибирующей молекулой, а, по всей видимости, участвует в регуляции иммунного ответа в периферических тканях.

Исследования показывают, что В7-Н4 может регулировать естественный и адаптивный иммунитет. У В7-Н4 нокаутных мышей обнаружено усиление нейтрофилов-опосредованной устойчивости к инфекции *Listeria monocytogenes* (Zhu *et al.*, 2009) независимо от адаптивного иммунитета. Отсутствие В7-Н4 приводит к усилению пролиферации Gr-1⁺ CD11b⁺ предшественников нейтрофилов в костном мозге. Таким образом, В7-Н4 может негативно регулировать реакцию нейтрофилов. В7-Н4 может также оказывать неиммунологические эффекты на опухолевые клетки. микроРНК В7-Н4 может эффективно ингибировать пролиферацию и миграцию LOVO клеток колоректальной карциномы (Peng *et al.*, 2015), что способствует метастазированию.

Было также показано, что В7-Н4 может усиливать иммунологические реакции в ответ на опухоли. При эндометриоидной аденокарциноме опухоли с низким уровнем риска имеют увеличенную экспрессию В7-Н4 на мембране (Miyatake *et al.*, 2007); похожий эффект наблюдается для доброкачественных опухолей молочной железы (Mugler *et al.*, 2007). Было показано, что В7-Н4 требуется для развития эффективного противоопухолевого иммунного ответа в мышинной модели рака молочной железы (Rahbar *et al.*, 2015). В отсутствие В7-Н4 наблюдается снижение экспрессии МНС класса I на опухолях и гранзима В в CD8⁺ Т-клетках (Rahbar and Ohashi, 2016).

Изложенные выше факты противоречат общепринятой концепции, что В7-Н4 играет ингибирующую роль в регуляции Т-клеточных ответов. Вполне

возможно, что В7-Н4 может иметь, по меньшей мере, два независимых рецептора (стимулирующий и ингибирующий), которые могут экспрессироваться на Т-клетках в разных условиях. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять молекулярные механизмы, которые определяют, как молекулы семейства В7 регулируют иммунитет.

Терапевтическое использование В7-Н4

Учитывая тот факт, что многие исследования показали повышенную экспрессию В7-Н4 на опухолевых клетках и возможную ингибирующую функцию, основные стратегии для разработки терапевтических агентов с использованием В7-Н4 направлены на элиминацию опухолевых клеток, экспрессирующих В7-Н4. Разработаны В7-Н4-специфичные химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptors (CARs)) для терапии рака яичника с помощью Т-лимфоцитов (Smith *et al.*, 2016). Антитела против В7-Н4, конъюгированные с химиотерапевтическими препаратами, также могут быть использованы для терапии рака молочной железы (Leong *et al.*, 2015). Было опубликовано сообщение, что в мышинной модели рака яичника введение МАТ против В7-Н4 приводит к снижению роста опухоли, что говорит о восстановлении иммунного ответа против опухолей при блокировке В7-Н4 (Dangaj and Scholler, 2013). Испытания моноклонального антитела 1Н3, блокирующего В7-Н4, на мышинной модели показали не только значительное ингибирование роста В7-Н4-положительных опухолей, но и обеспечили защиту при повторном введении опухолевых клеток в организм мышей (Jeon *et al.*, 2014). Определенный успех был также достигнут при использовании scFv, распознающего В7-Н4 (Dangaj and Scholler, 2013). Таким образом, В7-Н4 является перспективной мишенью для создания иммунотерапевтических средств, прежде всего МАТ, для терапии опухолей.

1.9 B7-H5

Идентификация B7-H5 (VISTA, GI24, Dies1, PD-1H)

В 2011 г. две исследовательские группы, ведя работы с корегуляторными молекулами мышей, одновременно опубликовали результаты исследования двух молекул: VISTA (V-domain Ig suppressor of T cell activation) и PD-1H (programmed death-1 homolog) (Wang *et al.*, 2011; Flies *et al.*, 2011). Сравнение нуклеотидных последовательностей двух открытых молекул показало, что они идентичны и гомологичны другим членам семейства B7; молекулу назвали B7-H5 (B7 Homolog 5). Внеклеточный домен мышиногo B7-H5 обладает высокой схожестью с B7-H1 и B7-DC. B7-H5 представляет собой трансмембранный белок I-го типа, состоящий из одного N-концевого домена иммуноглобулина (Ig) V, дополнительного участка из 30 аминокислот, трансмембранного домена и цитоплазматического хвоста длиной в 95 а.о. (Wang *et al.*, 2011; Flies *et al.*, 2011). Филогенетический анализ молекулы B7-H5 показал сходство с PD-1, CD28 и CTLA-4, с наивысшей идентичностью в аминокислотной последовательности с PD-1 (Flies *et al.*, 2011). Однако сравнение B7-H5 с другими членами семейства CD28 показывает некоторые различия. В отличие от геномно-кластерной группы CD28/CTLA4/ICOS, расположенной на 2-ой хромосоме, ген, кодирующий B7-H5, расположен на 10-ой хромосоме (10q22.1) без соседних членов иммуноглобулинового суперсемейства. Аминокислотная последовательность B7-H5 наиболее консервативна среди членов семейства B7 и показывает 76 % идентичности между молекулами мыши и человека и 31 % идентичности мышиной молекулы с аминокислотной последовательностью B7-

H5 Данио-рерио. Цитоплазматическая часть V7-H5 мыши и человека имеют 90,6 % идентичных аминокислот, что предполагает сходную функцию в передаче сигнала внутрь клетки (Flies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Для сравнения, цитоплазматическая часть молекулы PD-1 человека и мыши имеют только 59 % идентичности.

Экспрессия V7-H5

У мышей мРНК, кодирующая V7-H5, в основном ограничена кроветворными тканями, включая костный мозг, тимус, селезенку и лимфатические узлы. Легкие и тонкая кишка также имеют высокий уровень экспрессии V7-H5 мРНК, что, вероятно, связано с наличием инфильтрата лейкоцитов в этих тканях. Относительно низкие уровни мРНК V7-H5 также наблюдаются в сердце, мозге, мышцах, почках, яичках и плаценте (Wang *et al.*, 2011; Flies *et al.*, 2011).

В соответствии с данными, полученными с использованием мышей, у человека V7-H5 в основном обнаруживается в гематopoэтических тканях. Наивысшая экспрессия V7-H5 наблюдается на поверхности миелоидных клеток, включая циркулирующие (CD14^{dim}CD16⁺) и воспалительные (CD14⁺CD16^{+/-}) моноциты, а также на поверхности лимфоидных и миелоидных дендритных клеток (Lines *et al.*, 2014). Моноциты ВИЧ-инфицированных людей имеют повышенные уровни экспрессии V7-H5 по сравнению со здоровыми В- и Т-клетками (Bharaј *et al.*, 2014). Интересно, что высокий уровень экспрессии V7-H5 наблюдается для плаценты, что может говорить о роли этой молекулы в системе поддержания толерантности к плоду (Ni and Dong, 2017). V7-H5 экспрессируется на раковых клетках, в том числе клетках рака поджелудочной железы (Byers *et al.*, 2015). На поверхности же В-клеток и НК (CD56^{hi}) экспрессия человеческого V7-H5 не была обнаружена (Lines *et al.*, 2014).

Функция В7-Н5

Рекомбинантный химерный белок В7-Н5-Ig вызывает супрессию CD4+ Т-клеток, подавляя сигнал через Т-клеточный рецептор и останавливая деление клеток (Wang *et al.*, 2011). Кроме того, молекула В7-Н5, которая экспрессируется на АПК, может подавлять активацию антиген-специфичных Т-клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что В7-Н5 подавляет активацию Т-клеток. Кроме того, было показано, что CD4+ Т-клетки у мышей, лишенных VISTA, демонстрировали повышенный ответ на стимуляцию антигена (Le Mercier *et al.*, 2014).

Интересно, что взаимодействие В7-Н5 с пока не известной молекулой на поверхности Т- и В-клеток снижает их активацию (Green *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011). Эти наблюдения говорят о том, что Т- и В-лимфоциты экспрессируют рецептор, взаимодействующий с В7-Н5. С другой стороны, было показано, что антитела, которые взаимодействуют с В7-Н5 на поверхности Т-клеток, снижают их активацию. Более того, введение антител против В7-Н5 *in vivo* снижает воспаление, опосредованное CD4+ Т-лимфоцитами (Flies *et al.*, 2011; Flies, Higuchi and Chen, 2015). Эти наблюдения говорят о том, что В7-Н5 может функционировать и как рецептор, и как лиганд.

Терапевтическое использование В7-Н5

Недавно начались первые клинические испытания МАТ против В7-Н5 (JNJ-61610588) для терапии поздних стадий онкологических заболеваний (NCT02671955). Также проходят клинические испытания малой молекулы СА-

170, которая взаимодействует с PD-L1, PD-L2 и B7-H5 и стимулирует иммунный ответ (NCT02812875). Это первый блокатор точек контроля иммунного ответа, которые можно принимать перорально для терапии онкологических заболеваний.

1.10 B7-H6

Идентификация B7-H6 (NCR3LG1)

В 2009 году была опубликована статья, описывающая взаимодействие NKp30, рецептора нормальных киллеров, с мембранным белком, который был назван B7-H6 (Brandt *et al.*, 2009). B7-H6 (также известный как NCR3LG1) является лигандом для рецептора NKp30 – естественного рецептора цитотоксичности НК, активирующего передачу сигнала (Flajnik *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Связывание B7-H6 с рецептором NKp30 активирует НК и запускает механизм лизиса опухолевой клетки. B7-H6 контактирует с NKp30 через область CDR, сходную той, которая отвечает за распознавание антигена антителами (Kaifu *et al.*, 2011).

Экспрессия B7-H6

Лиганд B7-H6 экспрессируется на различных первичных опухолях человека, включая лейкемию, лимфому, меланому, карциному, астроцитому, желудочно-кишечные стромальные опухоли (Brandt *et al.*, 2009). Уровень экспрессии B7-H6 на клетках астроцитомы имеет положительную корреляцию со стадией онкологического заболевания.

В нормальных тканях мРНК B7-H6 не была обнаружена; это указывает на то, что ее экспрессия активируется трансформацией нормальных клеток в

опухолевые (Brandt *et al.*, 2009). Тем не менее В7-Н6 может индуцироваться на поверхности провоспалительных моноцитов CD14-CD16 и нейтрофилов при стимуляции провоспалительными цитокинами, такими как IL-1b и TNF α (Matta *et al.*, 2013).

В различных линиях опухолевых клеток представленность лиганда В7-Н6 на поверхности и экспрессия мРНК может сильно изменяться под воздействием разных факторов. Например, снижение экспрессии происходит при воздействии ингибиторов деацетилирования гистонов (Fiegler *et al.*, 2013). Воздействие на опухолевые клетки практически всеми стандартными противораковыми средствами, включая химиотерапию, лучевую терапию, нелетальный тепловой шок и терапию цитокинами (TNF- α), наоборот, усиливает экспрессию В7-Н6 в опухолевых клетках и повышает чувствительность опухоли к НК (Сао *et al.*, 2015).

Функция В7-Н6

Роль лиганда В7-Н6 в иммунном ответе заключается в устранении опухолевых клеток, экспрессирующих В7-Н6 либо непосредственно естественными киллерами (НК-клетки), либо опосредовано через секрецию цитокинов.

Один из механизмов, с помощью которых опухолевые клетки ускользают от иммунного наблюдения, заключается в том, чтобы препятствовать распознаванию молекулы В7-Н6 НК-клетками. Раковые клетки могут маскировать мембранный В7-Н6. Аналогично молекулам В7-Н1, В7-Н2, В7-Н3 и В7-Н4 лиганд В7-Н6 может находиться в виде растворимого внеклеточного домена, который высвобождается под воздействием протеаз, металлопротеаз и дезинтегрин. Растворимый В7-Н6 обнаруживается в крови пациентов с сепсисом, вызванным грам-отрицательными бактериями (Matta *et al.*, 2013).

Кроме того, у больных с меланомой IV стадии (Schlecker *et al.*, 2014), с нейробластомой высокого риска (HR-NB) (Semeraro *et al.*, 2015) также наблюдался повышенный уровень растворимого B7-H6 по сравнению со здоровыми людьми. Это говорит о том, что знание концентрации растворимого лиганда B7-H6 в сыворотке крови больных может быть полезно при прогнозировании тяжести заболевания.

Терапевтическое использование B7-H6

Благодаря тому что B7-H6 экспрессируется преимущественно на опухолевых клетках, эта молекула является хорошей мишенью для противораковой терапии. Zhang с соавторами предложили концепцию получения Т-клеток, содержащих химерный рецептор на основе NKp30. Подобные рекомбинантные клетки способны распознавать раковые клетки, положительные по B7-H6, и убивать их с помощью различных механизмов (Zhang, Wu and Sentman, 2012).

В 2010 году были получены МАТ 4E5.5 и 17B1.3, связывающиеся с внеклеточным доменом B7-H6 (патент WO2011070443A1). Использование подобных антител, конъюгированных с лекарственными веществами, возможно при лечении опухолей, экспрессирующих B7H6. Кроме того, так как НК опосредуют острое отторжение трансплантата, МАТ к B7-H6 можно использовать для противоположной цели. Антитела, способные блокировать взаимодействие NKp30 – B7-H6, способны подавлять отторжение трансплантатов

(<http://www.eapatris.com/Data/EATXT/eapo2013/PDF/201270654.pdf>).

1.11 В7-Н7

Идентификация В7-Н7

История открытия В7-Н7 схожа с историей открытия многих представителей семейства В7. Первоначально последовательность В7-Н7 была обнаружена в 1999 году в ходе скрининга базы данных EST и была названа HERV–HLTR–associating 2 (ННLA2) (Mager *et al.*, 1999). В 2003 году стало ясно, что молекула В7-Н7, проявляющая 10 %-18 % аминокислотной идентичности и 23 %-33 % схожести с другими белками В7, является новым представителем этого семейства (Flajnik *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Ген В7-Н7 расположен на третьей хромосоме, рядом с последовательностями, кодирующими CD80 и CD86. В отличие от других членов семейства В7-Н7 содержит 3 иммуноглобулин-подобных домена (Mager *et al.*, 1999). Ортологи В7-Н7 найдены у большого числа позвоночных за исключением грызунов.

Интересна история обнаружения рецептора В7-Н7, который начали искать сразу после признания молекулы ННLA2 членом семейства В7. Оказалось, что этот белок не взаимодействует с известными на тот момент членами семейства CD28 и семейства В7. Однако В7-Н7 ингибирует пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ и значительно снижает уровень синтеза ряда цитокинов (Zhao *et al.*, 2013). В 2013 году Чжу и его коллегами при поиске молекул, схожих с молекулами семейства CD28, была обнаружена гомологичная молекула, способная при экспрессии на клетках передавать положительный сигнал Т-клеткам. Было обнаружено, что эта молекула, названная CD28H, способна взаимодействовать с В7-Н7 на антигенпрезентирующих клетках (Zhu *et al.*, 2013). В 2015 году было обнаружено, что В7-Н7Ig связывается с клетками, экспрессирующими

молекулу TMIGD2 (Transmembrane and Immunoglobulin Domain Containing 2), в свою очередь TMIGD2Ig связывается с клетками 3Т3, экспрессирующими В7-Н7 (Janakiram *et al.*, 2015). При анализе последовательности TMIGD2 и CD28H оказалась, что они являются одной и той же молекулой, рецептором молекулы В7-Н7.

Экспрессия В7-Н7 и его рецепторов

Показана экспрессия белка В7-Н7 в клетках плаценты, а также клетках эпителия кишечника, почек, желчного пузыря и молочной железы. В клетках остальных органов экспрессия не обнаружена (Janakiram *et al.*, 2015).

Экспрессия В7-Н7 обнаружена на клетках иммунной системы, в частности на поверхности моноцитов и макрофагов человека, однако она отсутствует на незрелых дендритных клетках, покоящихся Т- или В-клетках. Впрочем, под действием воспалительных сигналов наблюдается регулируемое повышение экспрессии этого белка для ДК и моноцитов (Zhao *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Экспрессия В7-Н7 обнаружена на большом спектре раковых клеток человека: рак молочной железы, легкого, щитовидной железы, меланомы, поджелудочной железы, яичника, печени, мочевого пузыря, толстой кишки, простаты, почек и пищевода. В когорте из 50 пациентов с тройным отрицательным раком молочной железы I-III стадии у 56 % обнаруживалась экспрессия В7-Н7 на опухолевых клетках (Janakiram *et al.*, 2015).

Функции В7-Н7

Накопленный корпус фактов не позволяет однозначно отнести В7-Н7 к стимулирующим или ингибирующим молекулам. Взаимодействие между CD28H и В7-Н7 на АПК стимулирует пролиферацию Т-клеток человека и

продукцию цитокинов, таких как IFN- γ , IL-5, IL-10, TNF- α и IL-17 (Zhu *et al.*, 2013). С другой стороны, согласно исследованиям Zhao с соавторами, при наличии сигнала T-клеточного рецептора B7-H7 ингибирует пролиферацию как CD4 +, так и CD8+ T-клеток и значительно снижает продукцию цитокинов T-клетками, включая IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-13, IL-17a и IL-22 (Zhao *et al.*, 2013). Если попытаться опереться на то, что мы уже знаем про семейство B7, можно предположить, что противоположные результаты являются следствием наличия двух рецепторов, при этом CD28H является костимуляторным рецептором.

Терапевтическое использование B7-H7

Накапливается все больше свидетельств того, что молекула B7-H7 широко представлена на раковых клетках, при этом экспрессия этой молекулы связана с плохим прогнозом (Koirala *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2017). Поэтому B7-H7 является перспективной мишенью для создания терапевтических средств. Интересно, что терапия, нацеленная на B7-H7, может не только усилить противоопухолевые иммунные реакции, но также может ингибировать ангиогенез опухоли (Janakiram *et al.*, 2015).

1.12 ILDR2

Идентификация ILDR2

Совсем недавно была опубликована информация об еще одной молекуле семейства B7 – ILDR2 (от англ. Ig-like domain containing receptor 2) (Hecht *et al.*, 2018). ILDR2 мРНК человека кодирует мембранный белок первого типа, длиной 639 а.о., который содержит N-концевой сигнальный пептид, за которым

следует V домен (IgV) длиной 167 а.о., трансмембранный домен 20 а.о. и внутриклеточный участок 433 а.о. Также выявлены два альтернативные транскрипта ILDR2: один кодирует белок с коротким внутриклеточным участком (48 а.о.), второй транскрипт кодирует секретируемый белок без трансмембранного домена. Сравнение аминокислотной последовательности ILDR2 с другими белками семейства B7 показало 24-36 % гомологии, что типично для членов семейства B7. ILDR2 человека имеет 94 % гомологии с мышинным ортологом (Hecht *et al.*, 2018).

Экспрессия ILDR2 и его рецепторов

Высокие уровни экспрессии мРНК, кодирующей ILDR2, обнаружены в яичках и головном мозге. Более низкая экспрессия мРНК ILDR2 наблюдается в тканях почек, сердца и кишечника. МРНК, кодирующая мышиный ILDR2, имеет похожий профиль экспрессии (Hecht *et al.*, 2018). Это говорит о доминантной экспрессии ILDR2 в иммунопривилегированных тканях. Белок ILDR2 обнаружен на поверхности моноцитов, макрофагов и популяции НК-клеток. Рекомбинантный химерный белок ILDR2Ig связывается с активированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, что говорит об экспрессии рецептора ILDR2 на этих клетках.

Функция ILDR2

Трансфекция стимуляторных клеток конструкцией, обеспечивающей экспрессию ILDR2, значительно снижает пролиферацию и продукцию IL-2 человеческими Т-лимфоцитами. Активация человеческих и мышинных Т-клеток с помощью анти-CD3 и анти-CD28 МАТ также снижается в присутствии

ILDR2Ig (Hecht *et al.*, 2018). Важно отметить, что ILDR2Ig не вызывает апоптоза Т-лимфоцитов, но снижает их функциональную активность.

Терапевтическое использование ILDR2

Так как иммуномодулирующие эффекты ILDR2 описаны совсем недавно, еще нет данных о его терапевтическом использовании. Однако экспериментальные данные, полученные на мышинной модели ревматоидного артрита (РА), показывают, что инъекция ILDR2Ig значительно снижает симптомы РА и уровни коллаген-специфических IgG1 и IgG2a в сыворотке мышц (Hecht *et al.*, 2018). Также было показано, что внутривенное введение ILDR2Ig снижает развитие экспериментального аутоиммунного энцефалита и диабета первого типа у мышей (Podojil *et al.*, 2018). Более того, ILDR2Ig способствует приживаемости трансплантата костного мозга у мышей (Podojil *et al.*, 2018). Эти наблюдения говорят о потенциальной роли ILDR2 в регуляции иммунологической толерантности при аутоиммунных заболеваниях и трансплантации.

1.13 Бутирофилины

Первый бутирофилин был описан в 1980-х годах, молекулы бутирофилинов (BTN) получили свое название от белка butyrophilin 1 (современное название – butyrophilin subfamily 1 member A1 (BTN1A1)), был выделен из коровьего молока. Он играет важную роль в формировании, секреции и стабилизации молочных жировых шариков (Heid *et al.*, 1983; Franke *et al.*, 1981). Подобно семейству В7 члены семейства бутирофилинов, как правило, имеют два внеклеточных домена иммуноглобулина (IgV и IgC) и трансмембранный участок. Однако у бутирофилинов выявлен В30.2

внутриклеточный сигнальный домен, который отсутствует у молекул семейства B7 (рис. 4) (Ogg, Komaragiri and Mather, 1996). Сходство IgV и IgC доменов у BTN с B7 молекулами предполагает, что они могут использовать схожие механизмы взаимодействия с другими молекулами. Однако наши знания о молекулах, с которыми связываются BTN, весьма ограничены.

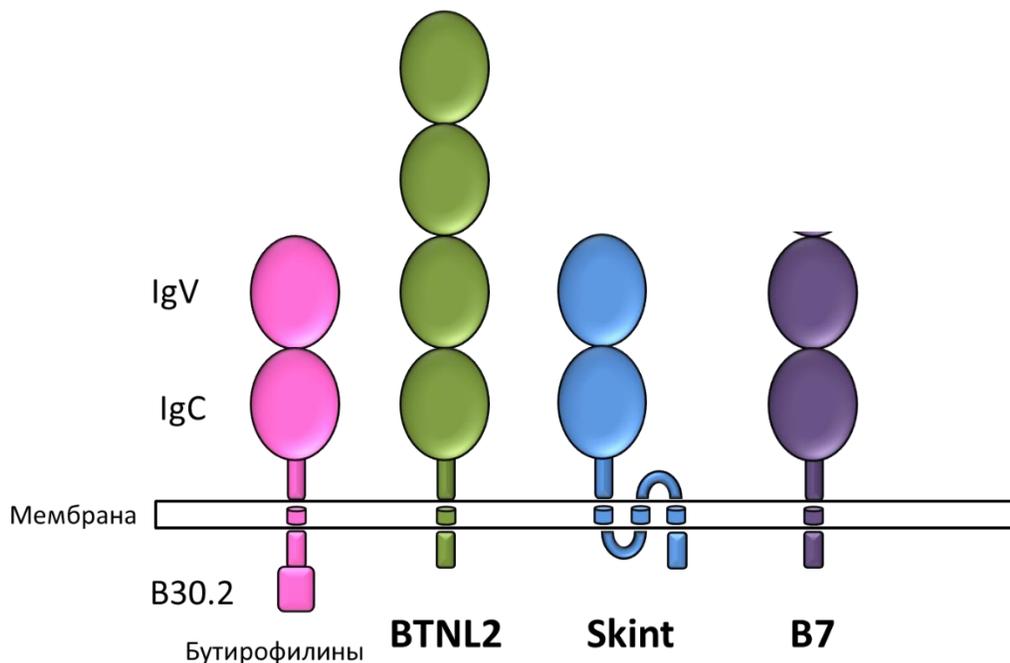


Рисунок 5. Структурная организация бутирофилинов (BTN) в сравнении с молекулами семейства B7. Молекулы бутирофилинов содержат домены иммуноглобулина (Ig) IgV и IgC, которые также характерны для семейства B7 (CD80 и CD86). Определяющим признаком семейства молекул BTN является цитоплазматический домен V30.2 (PRYSPRY), который не обнаружен у молекул семейства B7.

На настоящий момент для человека известны 13 молекул, которые относят к семейству бутирофилинов: 7 белков бутирофилинов (BTN1A1, BTN2A1, BTN2A2, BTN2A3, BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3); 5 бутирофилин-подобных белков (butyrophilin-like proteins – BTNL) – BTNL2, BTNL3, BTNL8, BTNL9, BTNL10) и SKINT-подобный фактор (SKINTL – selection and upkeep of

intraepithelial T cells) (Arnett and Viney, 2014; Abeler-Dörner *et al.*, 2012). Показано, что гены, кодирующие бутирофилины, представляют три филогенетические группы BTN1, BTN2 и BTN3, расположены на шестой хромосоме (6p22.1) в непосредственной близости от генов, кодирующих молекулы МНС класса I (Abeler-Dörner *et al.*, 2012). Гены, кодирующие бутирофилин-подобные белки, также представлены в трех кластерах BTNL3, BTNL8 и BTNL9 и расположены на пятой хромосоме (5q35) (Rhodes, Reith and Trowsdale, 2016).

Молекулы бутирофилинов и бутирофилин-подобных белков присутствуют в различных клетках и тканях, однако их доминантная экспрессия обнаружена в клетках эпителия. В то же время анализ количества РНК, кодирующей бутирофилины человека, не показал доминантной экспрессии в каких-либо тканях, уровень экспрессии практически во все тканях был низким (Rhodes *et al.*, 2001; Malcherek *et al.*, 2007). Btn2a2 белок был обнаружен в разных тканях мыши, а также на В-клетках, макрофагах и дендритных клетках (Smith *et al.*, 2010). Экспрессия BTN2A2 на антигенпрезентирующих клетках увеличивается после обработки IFN- γ и регулируется трансактиватором класса II (СИТА – class II transactivator) и регуляторным фактором X (RFX – regulatory factor X) (Sarter K 2015). Оба эти фактора являются важными регуляторами экспрессии белков МНС класса II (Reith W 2005), что подтверждает роль бутирофилинов в регуляции иммунного ответа. BTN3A1, BTN3A2 и BTN3A3 экспрессируются на клетках иммунной системы, таких как Т-лимфоциты, В-клетки, моноциты, дендритные клетки и NK-клетки (Compte *et al.*, 2004; Yamashiro *et al.*, 2010). Высокий уровень экспрессии BTNL3 и BTNL8 белков был обнаружен на нейтрофилах (Arnett, Escobar and Viney, 2009; Charoval *et al.*, 2013).

Физиологическое значение бутирофилинов заключается в активации и ингибировании иммунных реакций. В качестве примера можно назвать

бутирофилин BTN2A1, который взаимодействует с DC-SIGN (DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin), присутствующий на моноцитах и дендритных клетках и выполняющий функцию рецептора интернализации ВИЧ-1, HCV и ряда других патогенов (Malcherek *et al.*, 2007). Было показано, что BTN1A1, BTN2A2, BTNL2 ингибируют пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов через остановку клеточного цикла, а также снижают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток (Nguyen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2010; Yamazaki *et al.*, 2010). Эти бутирофилины снижают продукцию различных цитокинов, связанных с активацией Т-лимфоцитов, включая IL-2 и IFN- γ (Ammann, Cooke and Trowsdale, 2013). Было также показано, что введение рекомбинантного BTN1A1 понижает активацию Т-клеток и развитие экспериментального энцефаломиелита у крыс (Stefflerl *et al.*, 2000). BTNL2 *in vitro* активировывает экспрессию Foxp3, ключевого фактора, участвующего в регуляции иммунного ответа, ответственного за развитие клеток супрессоров (Ammann, Cooke and Trowsdale, 2013; Swanson *et al.*, 2013). В дополнение этот белок ингибирует сигналы через стимулирующие молекулы семейства B7, что приводит к снижению продукции IL-2, IL-13, IL-17 или IFN- γ (Swanson *et al.*, 2013). Моноклональные антитела против BTN3A взаимодействуют с BTN3A на поверхности Т-лимфоцитов и запускают ингибирующий сигнал, который приводит к снижению пролиферации Т-клеток (Yamashiro *et al.*, 2010).

Бутирофилины участвуют в регуляции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Было показано, что экспрессия SKINT1 на клетках эпителия в тимусе требуется для дифференциации V γ 5+V δ 1⁺ Т-лимфоцитов (Barbee *et al.*, 2011). Недавние публикации предоставили доказательства, что BTN3A1 участвует в распознавании антигенов V γ 9+V δ 2⁺ Т-лимфоцитами (Wang *et al.*, 2013a). Считается, что V γ 9+V δ 2⁺ Т-клетки являются первой линией защиты при инфекционных заболеваниях. Было показано, что B30.2 домен BTN3A1 и

VTN3A3 может участвовать в презентации фосфоантигенов $\gamma\delta$ Т-лимфоцитам (Sandstrom *et al.*, 2014).

Моноциты и дендритные клетки экспрессируют VTN3A1. Так, добавление в культуру этих клеток моноклональных антител увеличивает их выживаемость, снижает апоптоз и увеличивает экспрессию костимуляторных лигандов. Это говорит о том, что сигнал через молекулы бутирофилина регулирует функции этих клеток (Simone *et al.*, 2010). VTN3A1 и VTN3A2 регулируют продукцию IFN γ НК-клетками (Messal *et al.*, 2011). Таким образом, бутирофилины участвуют в регуляции функциональной активности не только Т-лимфоцитов, но и клеток врожденного иммунитета.

Высокий уровень экспрессии VTN3A на клетках рака яичника и печени может приводить к снижению функции опухолеинфильтрирующих Т-лимфоцитов (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2010). Полиморфные варианты VTN3A3 и VTNL2 генов могут быть связаны с увеличенной частотой возникновения рака яичника и простаты соответственно (Peedicayil *et al.*, 2010; Fitzgerald *et al.*, 2013).

Все сказанное выше предполагает, что бутирофилины могут быть потенциальными мишенями для терапии различных заболеваний. Некоторые из бутирофилинов снижают функции клеток иммунной системы и индуцируют дифференцировку Т-клеток супрессоров. Все это дает основания предположить, что их рекомбинантные аналоги могут быть использованы для терапии аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Экспрессия бутирофилинов на опухолевых клетках предполагает их роль в развитии опухоли. Разработка моноклональных антител против таких молекул может быть использована для иммунотерапии онкологических заболеваний. Участие бутирофилинов в дифференцировке $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов также дает основание предполагать их роль в противоопухолевом иммунитете.

Таблица 2. Бутирофилины: экспрессия, взаимодействие и иммунные функции.

Ген человека	Ген мыши	Экспрессия	Взаимодействие	Иммунологический эффект	Refs
VTN1A1	Btn1a1	Молочная железа, тимус, В-клетки	Т-клетки и макрофаги	Ингибирует Т-клетки	(Smith <i>et al.</i> , 2010; Robenek <i>et al.</i> , 2006)
VTN2A1	–	Клетки эпителия кишечника	DC- SIGN на ДК и моноцитах		(Arnett, Escobar and Viney, 2009; Malcherek <i>et al.</i> , 2007)
VTN2A2	Btn2a2	ДК, моноциты, В-клетки и клетки эпителия тимуса	Активированные Т-клетки	Ингибирует Т-клетки	(Arnett, Escobar and Viney, 2009; Smith <i>et al.</i> , 2010; Ammann, Cooke and Trowsdale, 2013)
VTN2A3	-	Псевдоген			(Rhodes, Reith and Trowsdale, 2016)
VTN3A1	–	Опухолевые клетки и различные иммунные клетки	В-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки	Активирует $\gamma\delta$ Т-клетки	(Arnett, Escobar and Viney, 2009; Compte <i>et al.</i> , 2004; Yamashiro <i>et al.</i> , 2010; Harly <i>et al.</i> , 2012)
VTN3A2	–	Опухолевые клетки и различные иммунные клетки	Неизвестно		(Le Page <i>et al.</i> , 2012; Arnett, Escobar and Viney, 2009; Compte <i>et al.</i> , 2004)
VTN3A3	–	Различные иммунные клетки	Неизвестно		(Compte <i>et al.</i> , 2004; Arnett, Escobar and Viney, 2009)
	Btnl1	Клетки эпителия кишечника и макрофаги	Активированные Т-клетки, В-клетки и ДК	Ингибирует Т-клетки	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2010; Bas <i>et al.</i> , 2011)
VTNL2	Btnl2	Клетки эпителия кишечника, макрофаги и ДК	В-клетки, Т-клетки и клетки эндотелия	Ингибирует Т-клетки	(Arnett, Escobar and Viney, 2009; Arnett <i>et al.</i> , 2007; Nguyen <i>et al.</i> , 2006; Valentonyte <i>et al.</i> , 2005; Swanson <i>et al.</i> , 2013)
VTNL3	–	Нейтрофилы	Неизвестно		(Arnett, Escobar and Viney,

					2009)
–	Btnl4	Клетки эпителия кишечника	Неизвестно		(Bas <i>et al.</i> , 2011)
–	Btnl5	Неизвестно	Неизвестно		
–	Btnl6	Клетки эпителия кишечника	Неизвестно		(Bas <i>et al.</i> , 2011)
–	Btnl7	Неизвестно	Неизвестно		
BTNL8	–	Нейтрофилы	Т-клетки	Активирует Т-клетки	(Arnett, Escobar and Viney, 2009; Chapoal <i>et al.</i> , 2013)
BTNL9	Btnl9	В-клетки	Активированные Т-клетки, В-клетки, ДК и макрофаги		(Arnett, Escobar and Viney, 2009; Yamazaki <i>et al.</i> , 2010)
BTNL10	Btnl10	Неизвестно	Неизвестно		
SKINTL	–	Неизвестно	Неизвестно		
–	Skint1	Клетки эпителия тимуса			(Barbee <i>et al.</i> , 2011)
–	Skint2	Лимфоидные и нелимфоидные ткани	Активированные Т-клетки и АПК	Ингибирует Т-клетки	(Yang <i>et al.</i> , 2007)
–	Skint3–11	Неизвестно	Неизвестно		

1.14 Костимуляция НК-клеток

Традиционно феномен костимуляции рассматривается в контексте активации Т-лимфоцитов. Принято считать, что первый сигнал через TCR-Аг-МНС комплекс, поддержанный костимуляторными молекулами В7 или TNF семейства, приводит к оптимальной активации Т-лимфоцитов и усилению антиген-специфического ответа. Однако недавние исследования показали, что рецепторы костимуляторных молекул экспрессируются также и на НК-клетках, которым не требуется взаимодействие с антигеном и МНС для активации (Baessler *et al.*, 2010). Более того, снижение экспрессии МНС класса I на поверхности соматических клеток служит сигналом для их лизиса НК-клетками (Vivier *et al.*, 2008). Функция костимуляторных рецепторов в регуляции активности НК-клеток остается неизученной. НК-клетки играют огромную роль во врожденном иммунном ответе против клеток неоплазмы и клеток, инфицированных вирусами.

Активация НК-клеток находится под жестким контролем набора стимулирующих и ингибирующих рецепторов, которые располагаются на поверхности клеток мишеней. У человека ингибирующие рецепторы НК-клеток представлены KIR (killer immunoglobulin receptors) и CD94/NKG2A гетеродимером. Активирующие рецепторы, которые запускают спонтанную клеточную цитотоксичность, включают NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D и DNAM-1. Fc γ RIIIA/CD16A, еще один активирующий рецептор, который взаимодействует с Fc-доменом антител, связавшимся с клетками-мишенями; это взаимодействие приводит к экзоцитозу гранул, содержащих перфорины и гранзимы. Этот процесс назван антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ).

Применяя моноклональные антитела против опухолеассоциированных антигенов, можно использовать АЗКЦ для терапии опухолей. В 1997 и 1998

годах для терапии не-Ходжкинской лимфомы и HER2+ рака молочной железы стали использовать Ритуксимаб (Rituximab, anti-CD20) и Трастузумаб (trastuzumab, anti-HER2) соответственно. С тех пор множество моноклональных антител против опухолеассоциированных антигенов используется для терапии различных злокачественных новообразований. Считается, что основным механизмом терапевтического эффекта МАТ является АЗКЦ. За последние годы несколько стратегий было использовано для усиления АЗКЦ в клинической практике. Эти стратегии включают: модификацию Fc-фрагмента антител, для увеличения аффинности взаимодействия с Fc-рецептором и усиления АЗКЦ; совместное введение цитокинов и антител, для дополнительной активации NK-клеток; блокада TGF- β и некоторые другие подходы. Ниже пойдет речь об использовании костимуляторных молекул для усиления АЗКЦ.

После взаимодействия антител с Fc-рецептором NK-клетки начинают экспрессировать на своей поверхности CD137 (4-1BB, костимуляторную молекулу семейства TNF) (Kohrt *et al.*, 2014). МАТ против CD137 увеличивают цитотоксическую активность NK- и Т-клеток (Chester *et al.*, 2018). С учетом этих фактов были начаты клинические испытания комбинации анти-CD137 МАТ и антител против ТАА (CD20) Ритуксимаб (NCT02420938, NCR01775631 и NCT01307267) или (Her2) Сетуксимаб (NCT02110082).

OX40, GITR и CD27 – другие рецепторы семейства TNF, которые способны активировать NK-клетки (Sanmamed *et al.*, 2015). МАТ агонисты против этих молекул разрабатываются во многих компаниях, в основном для стимуляции Т-лимфоцитов, однако их эффект на функции NK-клеток неизвестен. Альтернативная стратегия усиления цитотоксической функции NK-клеток может заключаться в манипуляции их взаимодействия с другими клеточными популяциями (рис. 6).

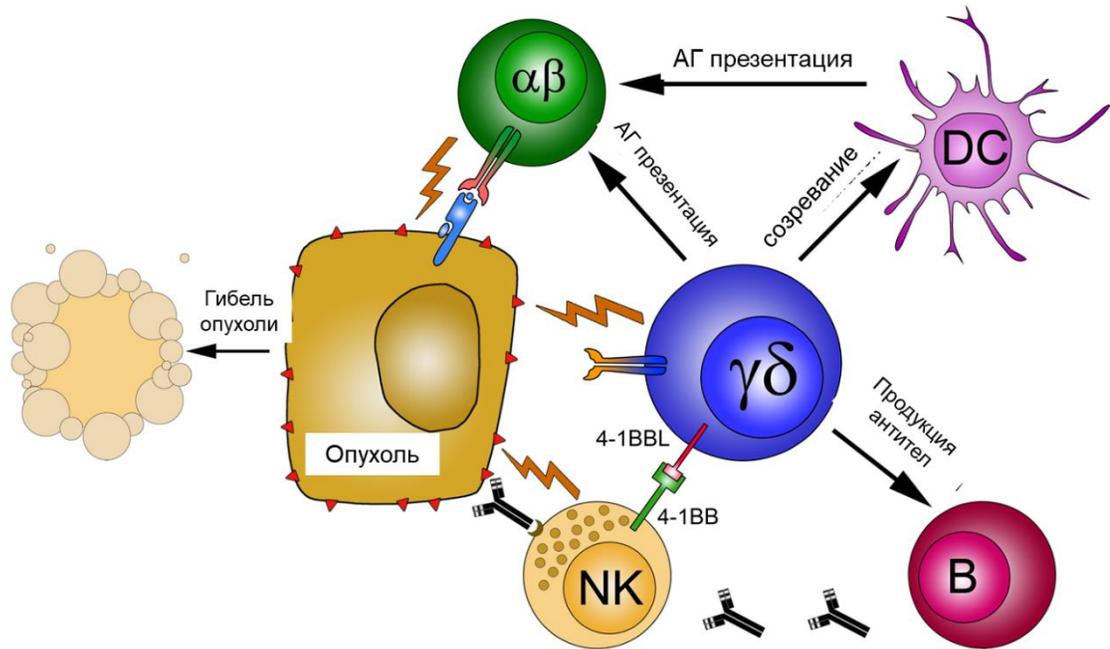


Рисунок 6. Эффекты $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на различные популяции иммунных клеток. $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов взаимодействуют с различными клетками иммунной системы, вызывая их активацию или дифференциацию. Результатом таких взаимодействий является эффективный ответ на инфицированные или опухолевые клетки.

1.15 Направления для будущих исследований

Все сказанное выше дает основание утверждать, что костимуляторные молекулы и иммунологические контрольные точки (ИКТ) являются мощным инструментом для манипуляций иммунологических реакций. Одним из фундаментальных вопросов современной иммунологии является выяснение уникальных и дублирующих функций костимуляторных молекул. Используя полученную информацию, можно будет разработать эффективные средства для терапии различных заболеваний. Несмотря на то, что некоторые костимуляторные лиганды, такие как В7-Н3 и В7-Н4, были описаны более 15 лет назад, рецепторы, с которыми они взаимодействуют, до сих пор не обнаружены. Обнаружение этих рецепторов позволит более точно понять

функции костимуляторных лигандов и разработать новые терапевтические инструменты. Обнаружение новых молекул с иммуномодулирующими свойствами также откроет возможности для более тонкой координации терапевтических интервенций.

Одним из перспективных направлений исследований в этой области является разработка альтернативных средств для манипуляции костимуляторными молекулами. В настоящее время в экспериментах и клинической практике, как правило, используют МАТ для блокировки ИКТ. Однако некоторые особенности моноклональных антител, такие как большая молекулярная масса, высокая иммуногенность, низкая стабильность и высокая себестоимость производства ограничивают их клиническое применение, что говорит о необходимости поиска других блокаторов ИКТ. Возможно, использование пептидов, аптамеров или малых молекул позволит решить некоторые проблемы, связанные с применением МАТ для блокировки ИКТ.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клеточные линии

Клеточные линии: 293НЕК (Human Embryonic Kidney) человеческих эмбриональных клеток почек, трансформированных ДНК аденовируса типа 5 (Ad 5), MDA MB523 аденокарциномы молочной железы человека, MCF7 аденокарциномы молочной железы, K562 эритромиелоидного лейкоза (NK-чувствительные клетки), НСТ 116 толстого кишечника, Daudi В-клеточной лимфомы, Jurkat Т-клеточной лимфомы, P815 клетки мышины (DBA/2) мастоцитомы, СНО (Chinese hamster ovary) были приобретены в АТСС (American Type Culture Collection, США). The 624mel клеточная линия меланомы человека была получена из лаборатории Dr. Wang (Национальный институт рака, США). Клеточные линии плоскоклеточной карциномы головы и шеи TU167, TU159 и MDA1986 были получены из лаборатории Dr. Clayman (M. D. Anderson Cancer Center, США). 012SCC клеточная линия плоскоклеточной карциномы головы и шеи была получена из лаборатории Dr. O'Malley (University of Pennsylvania, США). Mel526 клеточная линия меланомы была получена из лаборатории Dr. Storkus (University of Pittsburgh, США). Все клеточные линии выращивали и поддерживали в культуральной среде DMEM (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко; англ. Dulbecco's modified Eagle medium) или среде RPMI (англ. Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco-BRL, США) содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (Atlanta Biologicals, США), 25 mM HEPES, 1 % L-глутамин, пенициллин (100 единиц/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), 10 mM HEPES (все реагенты приобретены в Gibco, США) во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при 37 °С.

2.2 Моноклональные антитела и рекомбинантные белки

Использовали следующие МАТ с флуоресцентными метками:

- a) меченые PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex – перидинин хлорофилл протеин комплекс) МАТ против CD3 (клон SP34-2) были приобретены в BD Pharmingen (San Diego, США);
- b) меченые APC (Allophycocyanin – Аллофикоцианин) МАТ против CD56 (клон B159) и CD19 (клон H1B19) были приобретены в BD Pharmingen (San Diego, США);
- c) меченые PE (Phycoerythrin – фикоэритрин) МАТ против CD137 (клон 4B4-1), NKG2D (клон 1D11), HLA-A2 (клон BB7.2), CD80 (клон 16-10A1), CD69 (клон FN50), CD25 (клон M-A251) CD152 UC10-4F10-11 BD Pharmingen были приобретены в BD Pharmingen (San Diego, CA). CD137 (клон 4B4), CD14 (клон 61D3), CD54 (клон HA58), CD8 (клон SK1), CD134 (клон ACT35), CD25 (клон PC615) были приобретены в eBioscience, CD19 (клон H1B19), CD252 (клон 11C3.1), CD86 (клон IT2.2), CD137L (клон 5F4) были приобретены в Biolegend (San Diego, США);
- d) меченые FITC (Fluorescein isothiocyanate – флюоресцеина изотиоцианатом) МАТ против CD4 (клон RPA-T4), $\gamma\delta$ TCR (клон 11F2), CD80 (клон BB1), CD86 (клон IT2.2) CD59 ov9a2 CD64 (10.1) были приобретены в eBioscience (San Diego, США);
- e) неконъюгированные МАТ для функциональных тестов против asialo-GM1 (удаление NK-клеток) были приобретены в Wako (Osaka, Япония). МАТ против CD3 для стимуляции Т-лимфоцитов были приобретены в BD Pharmingen (San Diego, США). МАТ против NKG2D были приобретены в R&D Systems USA. Человеческий IgG1 получали из Sigma-Aldrich (St Louis, США);

- f) рекомбинантные химерные белки CTLA4Ig, CD28Ig, PD-1Ig и ICOSIg приобретались в R&D Systems (Minneapolis, США)

2.3 Поиск новых В7 белковых молекул и получение генов для клонирования

Был проведен поиск в EST (expressed sequence tag – экспрессированные маркерные последовательности), базе данных, содержащая более 800 различных кДНК библиотек из тканей и клеток человека (NCBI – National Center for Biotechnology Information) с помощью BLASTN и TBLASTN алгоритмов на гомологичные нуклеотидные последовательности опубликованных молекул семейства В7, таких как В7-1, В7-2, В7-Н1 и В7-Н2. Были найдены последовательности, имеющие 20-27 % идентичных аминокислот с другими молекулами семейства В7, которые были названы В7-Н3 и ВТNL8. Нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу, названную В7-Н3, была амплифицирована с помощью ПЦР из кДНК библиотеки, полученной из ТНР-1 клеток с помощью SMART PCR cDNA набора (Clontech, Palo Alto, США). ПЦР продукт был клонирован в рсDNA3.1 (–) вектор (Invitrogen, Carlsbad, США). Нуклеотидная последовательность была подтверждена секвенированием и помещена в GenBank базу данных под кодировкой AF302102.

Аналогично нуклеотидная последовательность, кодирующая две изоформы ВТNL8, которые были амплифицированы из кДНК библиотеки человеческого кишечника и вставлены в рCR2.1 вектор (Invitrogen, Carlsbad, США). Нуклеотидные последовательности были подтверждены с помощью Sanger's секвенирования на ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

2.4 Анализ РНК

Экспрессию В7-Н3 мРНК в человеческих тканях анализировали с помощью нозерн-блотинга на мембранах с кДНК различных тканей и клеток (10×10 см), приобретенных в Clontech (Palo Alto, США). В7-Н3 кДНК пробы метили с γ - ^{32}P АТФ (10 mCi/mL) в присутствии полинуклеотидкиназы, инкубируя 30 мин при 37 °С с последующей дезактивацией 20 мин при 65 °С. Мембраны обрабатывали с гибридизационным раствором (ExpressHyb Solution, Clontech, США) на шейкере 30 мин при 68 °С. В это время В7-Н3 пробы, меченые с ^{32}P , денатурировали при 95–100 °С 2–5 мин и быстро остужали на льду. Денатурированные пробы добавляли к мембранам и инкубировали на шейкере в течение 1 ч при 68 °С. После этого мембраны помещались на рентгеновскую пленку при -70 °С, пленка проявлялась, и сигнал оценивали визуально.

2.5 Трансфекция эукариотических клеточных линий рекомбинантными плазмидами

Для экспрессии генов костимуляторных молекул плазмиды рсDNA 3.1(-), содержащие фрагмент ДНК, кодирующий целую молекулу белка, были трансфицированы в 293, 624mel или Р815 клетки с использованием Fugene 6, смесью липидов с другими компонентами в 80 % этаноле (Promega, Madison, США). Клетки культивировали в чашках Петри диаметром 60 мм в культуральной в 3 мл среды, описанной выше. При достижении 50–80 % монослоя проводили трансфекцию клеток. Для этого 18 мкл Fugene 6 смешивали с 300 мкл культуральной среды и добавляли 6 мкг ДНК. 150-200 мкл полученной смеси добавляли в чашки Петри, аккуратно перемешивали и культивировали дополнительно 24-48 ч. Через 24-48 ч после трансфекции

клетки снимали с чашек. Для этого удаляли культуральную среду, добавляли 0,5 мл раствора трипсина-версена, пипетировали, вносили по 1,5 мл среды ДМЕМ, собирали клеточную суспензию и центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли, клетки ресуспендировали в 0,5 мл PBS, подсчитывали количество клеток в образце и использовали в экспериментах или замораживали при -70°C .

2.6 Получение стабильных клонов опухолевых клеток, экспрессирующих костимуляторные молекулы

Для получения стабильных клеточных линий клетки собирались через 48 ч после трансфекции, и примерно около 25-30 % клеток переносили в новые чашки Петри. В культуральную среду добавляли 125-250 мкг/мл неомицина: рсDNA3.1(-) вектор содержит ген устойчивости к неомицину. Клетки культивировали 14 дней, меняя среду, содержащую антибиотик, каждые 3-4 дня. Клетки, устойчивые к антибиотику, собирали и клонировали, помещая 0,3 клетки в каждую лунку 96-луночного планшета. Клетки из лунок, в которых выросли колонии из одной клетки, собирали и размножали в культуральных флаконах со средой, содержащей антибиотик. Однородность экспрессии костимуляторных молекул проверяли с помощью проточной цитометрии.

2.7 Получение рекомбинантных химерных белков

Для приготовления рекомбинантного химерного белка фрагмент внеклеточной части В7-Н3 длиной 729 нуклеотидов был амплифицирован из кДНК клона В7-Н3 с помощью ПЦР. Для амплификации использовали праймеры, комплементарные противоположным концам фрагмента (5'-ACACGAATCCCATGCTGCGTCGGCGGG-3' и 5'-

ACACAGATCTTTACAGTATCCGACGGGGA-3'), в которые были добавлены сайты рестрикции EcoRI и Bgl II. После обработки рестриктазами продукт ПЦР клонировали в pMIgV вектор, который содержал шарнирный участок (hinge), CH2 и CH3 регионы человеческого иммуноглобулина класса G1 (IgG1). Полученной плазмидой трансфицировали клетки 293T и выделяли рекомбинантный химерный B7-H3Ig белок из культуральной среды на Белок-А-сефарозе. Чистоту и размер белка проверяли с помощью электрофореза в 1 % полиакриламидном геле. Полученный продукт содержал более 95 % B7-H3Ig; содержание ЛПС, определённое с помощью люмулус теста (Sigma, США), не превышало 0,1 нг/мг. Другие рекомбинантные химерные белки получали аналогичным методом. В некоторых случаях вместо Fc-фрагмента человеческого IgG1 использовали Fc-фрагмент мышинового IgG2a.

2.8 Иммунизация лабораторных животных и получение поликлональных сывороток против B7-H3

Для получения антител, распознающих человеческий белок B7-H3, был синтезирован пептид YSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITTC, являющийся фрагментом со 142 по 165 белка B7-H3, который был выбран с помощью программы MacVector. Синтезированный пептид был конъюгирован с KLH. BALB/c мыши были иммунизированы пептидом сначала в полном адъюванте Фрейнда (Sigma, St Louis, США), затем проводили вторичную иммунизацию в неполном адъюванте Фрейнда. Сыворотки собирались через 10 дней после вторичной иммунизации. Специфичность антител определяли с помощью ИФА и проточной цитометрии.

2.9 Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК)

МКПК выделяли из лейкоцитарной массы крови центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) 20 мин при 400 g при комнатной температуре. Кольцо мононуклеарных клеток осторожно снимали пипеткой, переносили в чистую пробирку и отмывали 2 раза в PBS, содержащем 10 % ФТС центрифугированием при 1500 об/мин при 4 °С. Количество и жизнеспособность мононуклеарных клеток подсчитывали с окрашиванием трипановым синим. Жизнеспособность обычно составляла не менее 95 %.

2.10 Выделение и очистка клеточных популяций

Общую популяцию Т-лимфоцитов из МКПК обогащали с помощью нейлонового волокна, к которому прилипают В-клетки, моноциты и макрофаги. Нейлоновое волокно 1,5 гр упаковывали в пластиковые шприцы 20 мл и стерилизовали автоклавированием. Полученные колонки обрабатывали культуральной средой 6-8 мл при 37 °С 30 мин. Среду сливали и на колонки наносили МКПК $1-2 \times 10^8$ клеток в 2 мл культуральной среды. Колонки инкубировали при 37 °С 60 мин. Неприлипшие Т-лимфоциты смывали культуральной средой. Чистота популяции Т-клеток составляла 75-80 %, что определялось с помощью проточной цитометрии.

Очистку популяций лимфоцитов проводили также с помощью магнитных микрочастиц (Miltenyl Biotec, Auburn, США). Для прямого выделения популяций лимфоцитов МКПК инкубировались с антителами и/или магнитными микрочастицами, взаимодействующими с определенными маркерами популяции (например, CD19 для В-клеток, или CD4 для Т-хелперов). После инкубации МКПК пропускали через колонки, помещенные в

магнитное поле, где задерживались клетки, связавшиеся с магнитными микрочастицами. Колонки промывали с PBS, содержащим ЭДТА, и вынимали из магнитного держателя. Клеточные популяции, оставшиеся на колонках, смывали, промывали 2 раза центрифугированием при 1500 об/мин при 4 °С и использовали в экспериментах.

В качестве альтернативного метода очистки клеточных популяций использовали не прямое выделение, или удаление определенных клеток с помощью магнитных микрочастиц. Для этого МКПК или другая начальная популяция инкубировалась с набором антител и/или магнитных микрочастиц. Так, для непрямого выделения НК-клеток использовалась смесь, приобретенная в Miltenyl Biotec, которые удаляют не НК-клетки, такие как Т-клетки, В-клетки, стволовые клетки, дендритные клетки, моноциты, гранулоциты и эритроидные клетки с помощью магнитных микрочастиц и антител, конъюгированных с биотином. После очистки с магнитными микрочастицами чистота популяций составляла >98 %, что было определено с помощью проточной цитометрии.

2.11 Активация клеток *in vitro*

Активацию клеток *in vitro* производили в 24-луночных планшетах, где культивировали 5×10^6 клеток/лунку в 2 мл культуральной среды. Для активации CD3+ Т-лимфоцитов использовали ФГА (5 мкг/мл). Для активации CD19+ В-лимфоцитов использовали ЛПС (1 мкг/мл). Для активации CD14+ моноцитов использовали GM-CSF (800 единиц/мл, R&D Systems, Minneapolis США). Для активации дендритных клеток использовали IFN- γ (10 нг/мл, R&D Systems). Альтернативно, все клеточные популяции культивировались с комбинацией фармакологических стимуляторов ФМА (5 нг/мл) и иономицин (250 нг/мл).

2.12 Проточная цитометрия

Все эксперименты по окрашиванию маркеров на поверхности клеток проводились по следующему протоколу. Клетки ($0,25-1 \times 10^6$ клеток/пробирку) отмывались один раз с PBS, содержащим 1 % FBS и 0,05 % NaN_3 , и инкубировали с антителами или рекомбинантными химерными белками ($0,25-1$ мкг/пробирку) при 4°C 30 мин. Далее клетки отмывали и анализировали. При необходимости процедуру окрашивания повторяли со вторичными антителами против соответствующих изотипов, конъюгированных с флуоресцентной меткой. В большинстве экспериментов 3×10^4 гейтированных клеток собирались и анализировались с помощью BD LSRII проточного цитометра (Becton Dickinson, Franklin Lakes, США). Дальнейший анализ результатов производился с помощью FACS Diva программного обеспечения (Becton Dickinson).

Для окраски Р1ЦТЛ, выделенных из трансгенных мышей, использовали химерный белок Н-2Ld:Ig, состоящий из трех доменов мышинной молекулы МНС класс I (Н-2Ld), который присоединен к VH-региону мышинового IgG1. Химерный белок инкубировали с 40М Р1А пептидом (35-43 LPYLGWLVF) 24 часа при 4°C . Н-2Ld:Ig, нагруженный пептидом, затем использовали для окрашивания Р1ЦТЛ. В качестве вторичных антител использовали МАТ против мышинового IgG1, конъюгированных с PE.

2.13 Пролиферация и продукция цитокинов Т-лимфоцитами

Для тестирования эффектов костимуляторных молекул на пролиферацию и продукцию цитокинов очищенные Т-лимфоциты (1×10^5 клеток/лунку) культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах, на которых были сорбированы (иммобилизованы) в течение 10-16 часов антитела против CD3

(НIT3а; PharMingen, San Diego, США) в присутствии В7-Н3Ig или контрольных иммуноглобулинов (IgG1 человека или другие рекомбинантные Ig). В качестве альтернативного метода активации Т-клетки стимулировались с клеточными линиями, трансфицированными костимуляторными молекулами. Перед культивацией трансфицированные клетки облучали с помощью цезиевого гамма-облучателя (10000 рад) для того, чтобы остановить их рост. Если в экспериментах использовались мышинные Т-клетки, активация производилась по аналогичной схеме за исключением того, что МАТ против мышинной CD3 молекулы и мышинный В7-Н3Ig сорбировались на планшетах. Также для стимуляции использовались мышинные клеточные линии, трансфицированные мышинной В7-Н3. Т-лимфоциты культивировали в течение 72-96 ч, супернатанты собирались через 24, 48, 72 и 96 ч и использовались для тестирования уровней цитокинов. Для определения пролиферации в лунки добавляли радиоактивный ^3H -тимидин (1 мкCi/лунку) за 18 ч до окончания культивирования. Клетки из лунок переносились на фильтры с помощью харвестора, и уровни включения ^3H -тимидина считывали с помощью MicroBeta Trilix жидкостного сцинтилляционного счетчика (Wallac, Финляндия) в течение 1 минуты. Результаты тестирования пролиферации представлялись как среднее значение СРМ (counts per minutes) для трех повторов.

Другой метод, использованный для оценки пролиферации Т-клеток, заключался в добавлении BrdU в культуры клеток в последние 18 часов инкубации (BrdU включается во вновь синтезированную ДНК). Клетки после этого фиксируют в растворе, предоставленном производителем набора (Roche Molecular Biochemicals, США), отмывают и добавляют мышинные МАТ против BrdU. Взаимодействие МАТ с BrdU определяли с антителами против мышинных IgG, конъюгированных с HRP с последующим добавлением ТМВ субстрата. Пролиферацию оценивали по изменению оптической плотности в лунках.

2.14 Иммуноферментный анализ (ИФА)

Уровни цитокинов в супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения всех цитокинов использовали наборы BD OptEIA (BD Biosciences, San Jose, США), которые содержат цитокин-специфические улавливающие антитела (capture antibody), биотинилированные определяющие антитела (detection antibody), конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена и рекомбинантный цитокин в качестве стандарта. На 96-луночные планшеты Immulon (Thermo Scientific, США) сорбировали улавливающие антитела в 100 мкл на лунку с концентрацией 2 мкг/мл в сорбционном карбонатном буфере 0.1M pH при 4 °C в течение ночи. После этого планшеты блокировали 2 ч при комнатной температуре с PBS, содержащем 1 % OVA и 0,02 % Tween 20 (200 мкл/лунку). Затем вносили исследуемые образцы в объеме 100 мкл на лунку (две лунки на каждый образец) и делали 2-3 двукратных разведения. Разведения образцов делали в блокирующем растворе. Одновременно с образцами в колонки 1 и 2 вносили серийные разведения рекомбинантного цитокина (стандарта). Планшет с образцами инкубировали 1 час при комнатной температуре. По окончании инкубации проводили трехкратную отмывку на автоматическом вошере с PBS, содержащим 0,02 % Tween 20. Затем в планшет вносили смесь биотинилированных определяющих антител и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (1 мкг/мл и 0,5 мкг/мл соответственно). После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз и добавляли 100 мкл/лунку TMB субстрата. Планшеты выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1-5 мин до полного появления окрашенного продукта ферментной реакции. Остановку реакции осуществляли внесением в лунки равного объема 1M HSO. Оптическую плотность реакции фиксировали при длине волны 495 нм на спектрофотометре для планшетов модели 3550 (Bio-Rad, США).

Концентрацию цитокинов вычисляли по соотношению оптической плотности экспериментального образца и оптической плотности лунок стандарта цитокина с известной концентрацией.

Взаимодействие рецепторов и лигандов В7 семейства также оценивали с помощью ИФА. На 96-луночные планшеты Immulon (Thermo Scientific, США) сорбировали химерные белки известных лигандов В7-1Ig, В7-Н1Ig, В7-Н2Ig, ВТNL8Ig в концентрации 1 мкг/мл. Все химерные белки лигандов содержали Fc-домен мышиного IgG2a. После блокировки в лунки добавляли химерные белки известных рецепторов CD28Ig, СТLА4Ig, ICOSIg и PD-1Ig. Эти химерные белки содержат Fc-домен человеческого IgG1. Соответственно, взаимодействие химерных лигандов с химерными рецепторами определяли с помощью вторичных МАТ против человеческого IgG1, конъюгированных с пероксидазой хрена с последующим добавлением ТМВ субстрата. Связывание лигандов и рецепторов оценивали по изменению оптической плотности раствора.

Уровни антител различного изотипа специфических к ОVА в сыворотке мышей, иммунизированных с ОVА, определяли с помощью ИФА. Планшеты сорбировали с ОVА (5 мкг/мл) в течение ночи при 4 °С, блокировали и отмывали. Разведения сывороток и контрольных антител против ОVА различного изотипа (IgG1, IgG2a или IgG2b) добавляли в лунки. Планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре, отмывали и добавляли МАТ против мышиных IgG1, IgG2a или IgG2b, конъюгированные с HRP, и инкубировали 1 ч. Планшеты отмывали и добавляли ТМВ субстрат. Концентрацию антител в сыворотке вычисляли по соотношению оптической плотности экспериментального образца и оптической плотности лунок стандарта изотипа иммуноглобулина с известной концентрацией.

2.15 Анализ экспрессии мРНК различных цитокинов

Относительный уровень экспрессии мРНК, кодирующих 23 различных цитокина, определяли с помощью GEArray мембраны (SuperArray Inc., Bethesda, США). Т-лимфоциты (5×10^6 клеток/лунку), очищенные с помощью магнитных микрочастиц непрямым методом, инкубировали в 24-луночных планшетах сорбированных с антителами против CD3 (40 нг/мл) + контрольные Ig или B7-H3Ig (10 мкг/мл). Через 24 ч Т-лимфоциты собирали, осаждали центрифугированием и помещали в 1 мл TRI Reagent (Sigma, США) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Добавляли 0,2 мл хлороформа в TRI Reagent, встряхивали и центрифугировали при 12,000 g 15 мин при 4 °C. Верхнюю водную фазу, содержащую РНК, собирали и осаждали в 0,5 мл изопропанола центрифугированием при 12,000 g 10 мин при 4 °C. Осадок промывали в 75 % этаноле и растворяли в дистиллированной воде. Количество и качество РНК оценивали на спектрофотометре. 5 мкг полученной РНК переводили в кДНК с помощью MMLV обратной транскриптазы (Promega, США) в присутствии α - 32 P-dCTD (NEN, США). Полученные пробы кДНК гибридизовали на GEArray мембране, на которую нанесены специфические кДНК 23 цитокинов. Уровень радиоактивного сигнала от гибридизованных проб считывали с помощью фосфоимеджера (Molecular Dynamics, США). Уровень сигнала для каждого цитокина нормализовали по сигналу проб, специфических для β -актина на мембране, и рассчитывали условные единицы экспрессии мРНК. Расчеты производили по следующей формуле:

$$\text{Цитокин мРНА условные единицы} = \frac{(\text{сигнал цитокина} - \text{фоновый сигнал})}{(\text{сигнал } \beta\text{-актина} - \text{фоновый сигнал})}$$

2.16 Генерация ЦТЛ и оценка цитотоксичности

ЦТЛ генерировали в 24-луночных планшетах, культивируя Т-клетки (5×10^6 клеток/лунку), очищенные с помощью волокон нейлона, в присутствии облученных (10,000 rad) 624mel клеток (1×10^5 клеток/лунку) трансфицированными pcDNA3.1 (-) плазмидой, кодирующей В7-Н3, или пустым pcDNA3.1 (-) вектором. Клетки культивировались в течение 5 дней, цитотоксическая активность определялась в 4-часовом тесте высвобождения радиоактивного хрома $^{51}\text{[Cr]}$. Опухолевые клетки мишени ($1,5\text{-}3 \times 10^6$ клеток) смешивали со 100 мкCi $\text{Na}_2 \text{ } ^{51}\text{[Cr]O}_4$ в 0,15 мл культуральной среды и инкубировали 90 мин при 37 °С, часто встряхивая. Мишени отмывали от излишков $^{51}\text{[Cr]}$ и раскапывали в 96-луночные планшеты с V-образными лунками (4×10^3 клеток/лунку). Эффекторныe клетки добавляли к мишеням в лунки, чтобы достичь эффектор:мишень соотношения от 100:1 до 6,25:1. Для проверки антителозависимой клеточной цитотоксичности перед началом теста в лунки добавляли 4 мкг/мл Ритуксимаба (rituximab) или Цетуксимаба (cetuximab). В некоторых экспериментах в лунки добавляли антитела против NKG2D для того, чтобы проверить роль этой молекулы в цитотоксической активности НК-клеток. Планшеты инкубировали 4 часа при 37 °С во влажной атмосфере 5 % CO_2 . Планшет центрифугировали 5 мин при 200 об/мин и 100 мкл супернатанта переносили в новый планшет, куда добавляли 100 мкл сцинтилляционной жидкости, перемешивали и высвобождение $^{51}\text{[Cr]}$ определяли с помощью MicroBeta Trilix жидкостного сцинтилляционного счетчика (Wallac, Финляндия). Спонтанное высвобождение $^{51}\text{[Cr]}$ (клетки мишени, инкубированные с культуральной средой) обычно было меньше 15 % от максимального высвобождения $^{51}\text{[Cr]}$ (клетки мишени, инкубированные с 5 % SDS). Каждое соотношение эффектор:мишень тестировалось в трех лунках.

Результаты цитотоксических тестов выражались как процент цитотоксичности, который вычислялся по следующей формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = (\text{экспериментальный СРМ} - \text{спонтанный СРМ}) / (\text{максимальный СРМ} - \text{спонтанный СРМ}) \times 100.$$

2.17 Генерация дендритных клеток (ДК)

Дендритные клетки генерировали путем культивирования прилипающей к пластику фракции МКПК. Для этого МКПК в концентрации 3×10^6 клеток/мл помещали в пластиковых чашках Петри диаметром 100 мм (Corning, США) на 2 часа в 3 мл культуральной среды. Затем неприлипшую фракцию удаляли, а оставшиеся клетки инкубировали в полной культуральной среде в присутствии 800 ед/мл GM-CSF (Leukine, Immunex, Seattle, США) и 5 нг/мл IL-4 (Bio Source International, Camarillo, США) в течение 5 суток при 37 °C в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂. После этого ДК отмывали от цитокинов, подсчитывали и использовали в экспериментах.

2.18 Антисмысловые олигонуклеотиды и дендритные клетки (ДК)

Антисмысловые (AS) олигонуклеотиды, комплементарные нуклеотидным последовательностям 77–52 (GTGAGGCAGAACCACAGTGCTCCCA) и 195–170 (GAGGTTGAGCTGTGCCAGGCTGAAG) человеческого B7-H3 (AS-1 и AS-2 соответственно), были синтезированы в молекулярном центре коллективного пользования клиники Мэйо (Mayo Clinic Molecular Core Facility, США). В качестве контроля использовали обратную последовательность AS-1, чтобы сохранить композицию нуклеотидных оснований. Олигонуклеотиды растворяли в PBS (1 мМ), стерилизовали фильтрацией через фильтры с диаметром пор 45 мкм и хранили при –20 °C. ДК генерировали, как описано

выше. ДК трансфицировали AS с использованием FuGene 6, как описано выше. AS олигонуклеотиды с FuGene 6 в финальной концентрации 4 мкМ добавляли к ДК, которые инкубировались при 37 °С. Вторую дозу AS с FuGene6 добавляли 8 ч спустя вместе с человеческим рекомбинантным IFN- γ 10 нг/мл (R&D systems, США). Клетки инкубировали в течение ночи при 37 °С в 5 % атмосфере CO₂, отмывали, оценивали экспрессию B7-H3 и использовали для стимуляции аллогенных Т-лимфоцитов. ДК (2×10^5 клеток/лунку) и очищенные Т-лимфоциты инкубировались в 24-луночных планшетах 48 ч, после чего уровни IFN- γ в супернатантах оценивали с помощью ИФА.

2.19 Мыши

DBA/2, CByD2F1/J (DBA/2 \times BALB/c), C57BL/6 и BALB/c nu/nu были приобретены в Национальном институте рака (Frederick, США). Трансгенные мыши, экспрессирующие на поверхности CD8⁺ Т-лимфоцитов TCR, специфический для опухолевого антигена P1A в контексте H-2L^d молекулы (P1ЦТЛ), были получены из лаборатории Dr. Yang Liu (Sarma *et al.*, 1999).

2.20 Получение клеточных суспензий

Суспензии клеток селезенки мыши C57BL/6 получали посредством гомогенизации фрагментов ткани в охлажденной среде, клетки отмывали центрифугированием при 1200 об/мин при 4 °С. Определение количества клеток в суспензии и их жизнеспособности проводилось по общепринятой методике с использованием в качестве красителя 1 % раствора трипанового синего на изотоническом физиологическом растворе.

2.21 Рост опухолей и пролиферация ЦТЛ *in vivo*

DBA/2 или BALB/c nu/nu мышам вводили подкожно 5×10^4 P815 или P815 B7-H3 клеток (клон E3: P815, экспрессирующие мышиную B7-H3) в 100 мкл PBS. Средний диаметр опухолей и выживаемость мышей оценивали 2-3 раза в неделю. Некоторые мыши также получали внутрибрюшинные инъекции МАТ (500 мкг/мышь) против CD4, CD8 или asialo-GM1 (NK-клетки) на 0, 7, и 14 день после введения опухолей. Для того, чтобы оценить иммунологическую память мышами, которые отторгли P815 B7-H3 опухоли повторно, вводили P815 клетки через 60 дней после первичной инъекции опухолевых клеток. Выживаемость мышей оценивали каждый день. Через 30 дней после вторичной имплантации опухолевых клеток у мышей выделяли спленоциты и тестировали их цитотоксическую активность против P815 опухолевых клеток, как описано выше.

В модели адоптивного переноса клетки селезенки и лимфатических узлов, полученные от P1ЦТЛ трансгенных мышей, вводили внутривенно в CByD2F1/J мышам (1×10^6 клеток/мышь). Эти мыши также получали инъекцию 5×10^4 P815 или P815 B7-H3 опухолевых клеток в тот же день. Выживаемость мышей и размер опухолей оценивали 2-3 раза в неделю.

Для того, чтобы оценить пролиферацию ЦТЛ *in vivo*, CD8⁺ Т-лимфоциты, выделенные из P1ЦТЛ трансгенных мышей с помощью магнитных микрочастиц (непрямой метод), метили с CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester). Очищенные P1ЦТЛ (20×10^6 клеток) инкубировали с CFSE 20 мин при 37 °C, отмывали и вводили внутривенно экспериментальным животным (CByD2F1/J мыши). Мыши также получали подкожную инъекцию P815 или P815 B7-H3 опухолевых клеток за 6 дней до введения CFSE, меченных P1ЦТЛ. Лимфоциты из лимфоузлов, дренирующих опухоли, и селезенки выделяли на 2, 3 и 5 день и окрашивали с МАТ против CD8-Cy и P1A/H-2Ld:Ig димером.

Деление клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Последовательное снижение уровня CFSE флюоресценции на клетках говорит об их пролиферации.

2.22 Иммунизация лабораторных животных с овальбумином (OVA)

BALB/c мыши получали внутрибрюшинную инъекцию 5 мг/кг человеческого IgG1 (Sigma, США) или BTNL8Ig в течение первых шести дней эксперимента. На второй день эксперимента мышам вводили OVA (5 мкг/мышь), адсорбированный в гидроксиде алюминия (Accurate AlHydroGel; Accurate Scientific, США). Для оценки первичного иммунного ответа сыворотки от мышей забирали через 16 дней после иммунизации. Для оценки вторичного иммунного ответа мышам вводили OVA (5 мкг/мышь) на 23 день эксперимента и сыворотки забирали через 7 дней. Сыворотки замораживали для последующего тестирования изотипа OVA специфических IgG.

2.23 Стимуляция и приготовление клеток для панели ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Клетки для экспериментов с ПЦР в реальном времени были приобретены из Clonetics (Walkersville, США), включая легочные фибробласты, фибробласты кожи, эпителиальные клетки легких, клетки гладких мышц артерии и эпителиальные клетки сосудов. Ткани тимуса, селезенки, лимфоузлов, поджелудочной железы, щитовидной железы, слюнной железы, гипофиза, надпочечников, спинного мозга, головного мозга, сердца, скелетных мышц, тонкого и толстого кишечника, желудка, мочевого пузыря, почек, печени, легких, трахеи, яичников, матки, простаты и яичек были получены из различных источников. Th1 и Th2 клетки получали путем культивирования

CD4+ Т-лимфоцитов с IL-12 (5 нг/мл) и МАТ против IL-4 (1 мкг/мл) или с IL-4 (5 нг/мл) и МАТ против IFN- γ (1 мкг/мл) соответственно. Моноциты выделялись из МКПК с помощью МАТ против CD14 и магнитных микрочастиц (Miltenyi Biotec) и активировались в течение 6 часов с ЛПС 100 нг/мл. Из CD14+ клеток также генерировали дендритные клетки, культивируя их с GM-CSF 50 нг/мл и IL-4 5 нг/мл в течение 5–7 дней с последующей активацией с МАТ против CD40 1 мкг/мл или ЛПС 100 нг/мл. В-клетки получали из миндалин, миндалины гомогенизировали и клетки осаждали центрифугированием в культуральной среде. Для выделения нейтрофилов МКПК центрифугировали на градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), как описано выше, чтобы убрать мононуклеарные клетки. Нижнюю фракцию использовали для седиментации нейтрофилов с 1,5 % декстраном, эритроциты удаляли с помощью гипотонического лизиса. Оставшиеся клетки (>90 % нейтрофилы) осаждали центрифугированием и осадок ресуспендировали в культуральной среде. Половину очищенных нейтрофилов стимулировали 6 часов с ЛПС 100 нг/мл и TNF- α 10 нг/мл, в то время как другая половина оставалась без стимуляции.

РНК из образцов клеток и тканей извлекали с помощью TRI Reagent (Sigma, США), как описано выше. Образцы нормализовались в ПЦР-РВ амплификациях с помощью праймеров, специфических для человеческого β -актина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)). ПЦР-РВ с использованием нормализованных образцов проводили, используя BTNL8 специфические праймеры и пробы (табл. 3) на ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, США) в Taqman Master Mix, как рекомендовано производителем. Обычно результаты ПЦР-РВ представлялись как СТ (СТ; cycle threshold) значение порога циклов ПЦР-РВ, что означает количество циклов ПЦР, когда уровень сигнала флуоресценции экспоненциально увеличивается выше уровня фоновой

флюоресценции. Значения СТ выше 35 считались обозначающими отсутствие экспрессии гена. В настоящей диссертации результаты представлены как ΔCT , где $\Delta CT = 35 - CT$ в экспериментальном образце.

Таблица 3. Праймеры и пробы, использованные для определения мРНК, кодирующих две изоформы BTNL8.

Изоформа	Праймеры	Последовательность	Ампликон
В7 (короткая)	прямой	GTGTAAGCGAGAAGAAGCAT	100 п.н.
	проба	ATCTCTGATCCTGTCCCTGCTGAAC	
	обратный	TAGAAGAAGAGAAGCAGCTGGAT	
BTN (длинная)	прямой	CATTGTTGGACTGAAGATTTTCTT	83 п.н.
	проба	CTCCAAATTCCAGTGGAAAATCCAGG	
	обратный	CCTGTCCGTGCTTTCTTCTC	

2.24 Активация $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, прайминг НК-клеток и их совместное культивирование

МКПК (1×10^6 клеток/мл) культивировали в полной культуральной среде в присутствии 15 мкМ изопентинил пирофосфат (isopentenyl-pyrophosphate, IPP; Sigma-Aldrich, США) и 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 (Biological Resources Branch, National Institutes of Health, Bethesda, США). Свежая культуральная среда и IL-2 100 ед/мл добавлялись в культуры каждые 3 дня. После 14 дней культивирования клетки собирались и процент $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов определяли с помощью проточной цитометрии. Обычно культуры клеток содержали 60-90 % $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. В качестве альтернативного метода МКПК (3×10^6 клеток/мл) культивировали с 15 М Зометы (Zometa; Novartis, США) в присутствии или без 10 мкг/мл Ритуксимаба (Rituximab; Genentech, США). Через 48 ч активацию клеток оценивали по экспрессии маркеров активации или в цитотоксическом тесте. В некоторых экспериментах $\gamma\delta$ Т-лимфоциты удаляли с помощью магнитных микрочастиц из популяции МКПК.

Для прайминга NK-клеток 24-луночные планшеты сорбировались с hIgG1 (2,5 мкг/мл) в PBS при 4 °C в течение ночи. Очищенные NK-клетки (2×10^6 клеток/лунку) культивировались в течение 48 ч одни или в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (1×10^6 клеток/лунку), активированных с IPP+IL-2. После культивирования NK-клетки исследовали с помощью проточной цитометрии или очищали с использованием магнитных микрочастиц для исследования цитотоксической активности. NK-клетки (1×10^6 клеток) также культивировались с TU167 клетками (1×10^6 клеток) в присутствии 10 мкг/мл hIgG1 (контроль) или МАТ Цетуксимаб (Bristol-Myers, США). TU167 клетки экспрессируют на своей поверхности EGFR (epithelial growth factor), который связывается с Цетуксимабом, что обеспечивает условия для прайминга NK-клеток.

Клетки также культивировали разделенными мембраной (диаметр пор 0,4 мкм), проницаемой для растворимых факторов. Очищенные NK-клетки (2×10^6 клеток/лунку) помещались в 24-луночные планшеты, покрытые человеческими IgG1 (10 мкг/мл). IPP-активированные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты ($0,5 \times 10^6$ клеток/мл) помещались в специальные вставки (Transwell; Costar, США) для 24-луночных планшетов и культивировались сверху NK-клеток. Такое культивирование позволяет избежать клеточного контакта и определить – межклеточные взаимодействия или растворимые факторы играют роль в активации клеток. В некоторых экспериментах NK-клетки культивировались с P815 клетками, трансфицированными CD137L в присутствии иммобилизованных IgG1. Клетки культивировались в течение 48 ч. Экспрессия маркеров активации определялась с помощью проточной цитометрии.

Для изучения роли взаимодействия молекул, экспрессируемых на поверхности клеток в активации NK-клеток, в культуры добавляли химерные белки (такие как CD137Ig, CD152Ig или CD134Ig) в концентрации 10 мкг/мл.

После 48 ч инкубации НК-клетки тестировались на экспрессию маркеров активации или использовались для анализа цитотоксической активности.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Клонирование и характеристика В7-Н3

Как было описано выше, молекулы семейства В7 (В7-1, В7-2, В7-Н1 и В7-Н2) играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что среди новых членов семейства могут существовать молекулы, имеющие гомологию с известными молекулами семейства В7, которые также вовлечены в регуляцию иммунного ответа. С использованием последовательностей всех ранее опубликованных молекул семейства В7 был произведен поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей в открытой базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и частной базе данных Human Genome Sciences Inc (США). Среди нуклеотидных последовательностей, присутствующих в дендритных клетках человека, была выявлена молекула, которая имеет характеристики, сходные с молекулами семейства В7. Наличие нуклеотидной последовательности, кодирующей новую молекулу семейства В7, в антигенпрезентирующих клетках была подтверждена путем анализа мРНК, выделенных из ТНР-1 и дендритных клеток, с помощью ПЦР. Молекула была названа В7-Н3 (В7 Homolog 3). Найденная нуклеотидная последовательность кодирует две изоформы белка, 316 и 534 а.о. (рис. 7 и 8). Идентичность в предсказанной аминокислотной последовательности внеклеточного домена короткой изоформы новой молекулы с другими человеческими молекулами семейства В7 достигала: В7-Н2 – 32 %, В7-Н1 – 27 %, В7-1 – 23 %, В7-Н7 – 23 %, В7-2 – 21 %, В7-Н6 – 21 %, В7-Н4 – 17 %, В7-Н5 – 17 % (рис. 8А и табл. 4).

Предсказанный В7-Н3 белок состоит из N-концевого сигнального пептида, внеклеточных V- и C-Ig доменов, трансмембранного домена и цитоплазматического хвоста в 45 а.о. (рис. 8Б). Это означает, что В7-Н3

является трансмембранным белком I-го типа, принадлежащим к Ig суперсемейству. Как и другие члены В7 семейства, В7-НЗ имеет четыре консервативных цистеина, которые принимают участие в формировании V- и C-Ig доменов. Отсутствие гептада (heptad) а.о. последовательности (НРРНСРС) и С-концевого В30.2 домена указывает на то, что В7-НЗ не принадлежит к гликопротеинам семействам бутирофилинов (butyrophilin) и миелин олигодендроцитов (myelin oligodendrocyte) (Linsley *et al.*, 1994; Henry, Miller and Pontarotti, 1999). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что В7-НЗ относится к семейству молекул В7.

4Ig В7-НЗ состоит из 10 экзонов, кодирующих сигнальный пептид (СП), V1 домен, C1 домен, V2 домен, C2 домен, трансмембранный домен и три цитоплазматических домена. Короткая форма В7-НЗ образуется за счет альтернативного сплайсинга экзона 2 и экзона 5, что приводит к отсутствию C1 и V2 доменов (рис. 7). Анализ мышинового генома показал, что мышинный В7-НЗ состоит из 8 экзонов. Мышиный ген содержит два псевдоэкзона (C1 и V2), в последовательностях которых содержатся множественные стоп-кодоны; в результате у мыши обнаружена только одна, короткая изоформа В7-НЗ (рис. 7).

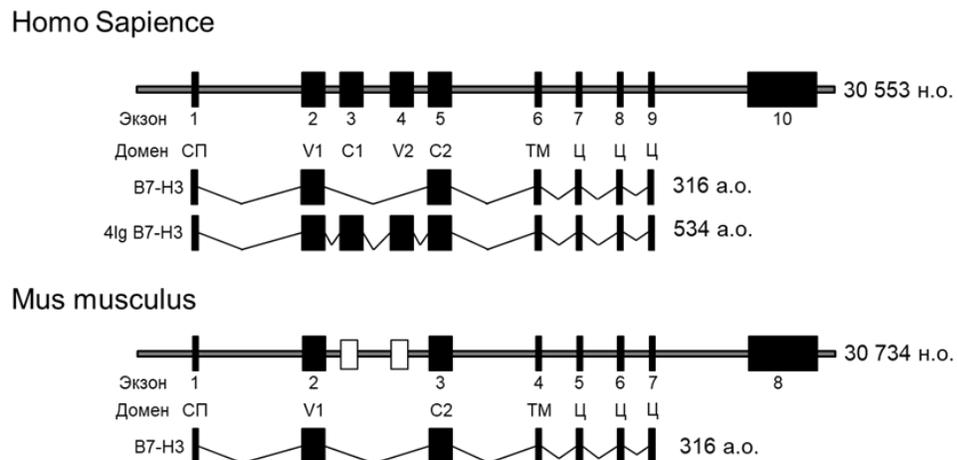
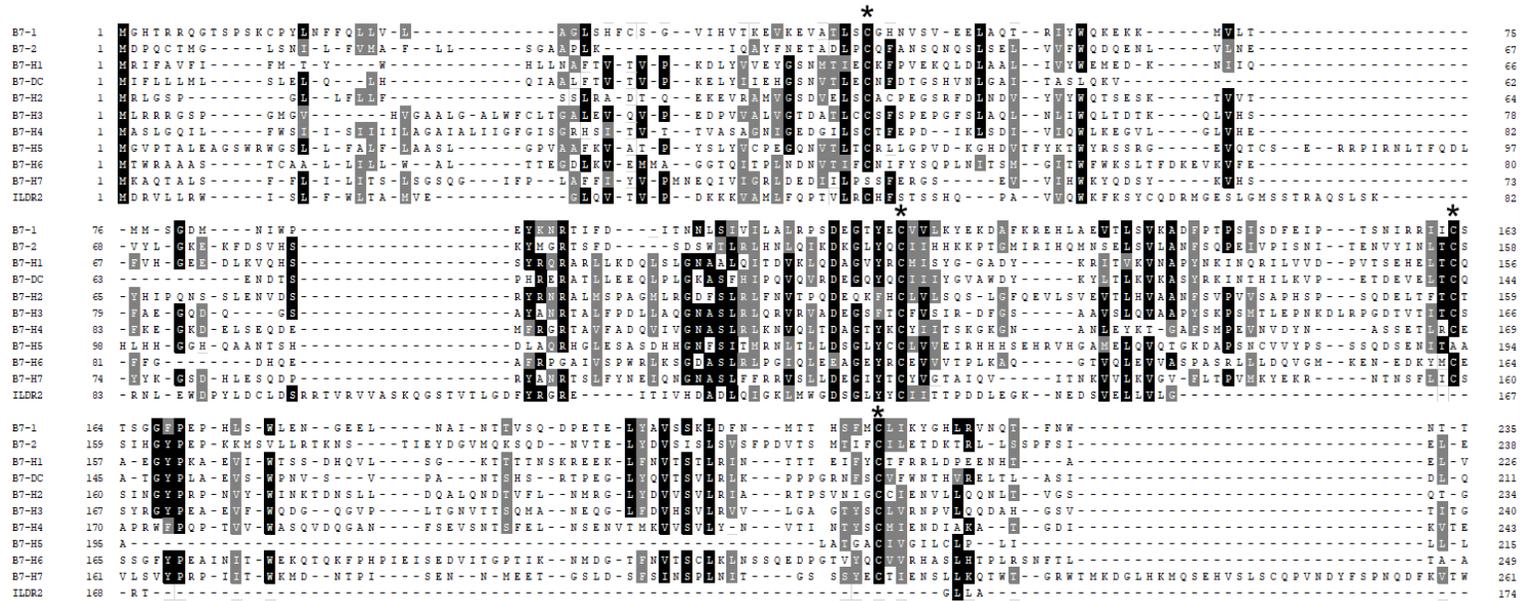


Рисунок 7. Геномная организация локуса В7-НЗ человека и мыши. Последовательности взяты из базы данных NCBI. NC_000015.10 – Homo sapiens и NC_000075.6 – Mus musculus

A



B

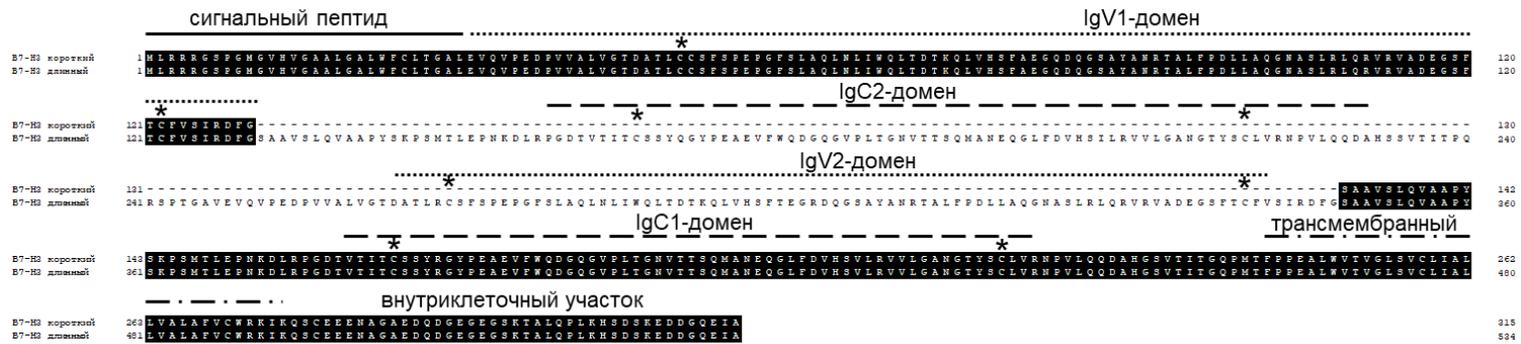


Рисунок 8. Сравнение внеклеточных доменов молекул семейства В7. (А) Идентичные аминокислоты отмечены черным цветом, гомологичные аминокислоты отмечены серым цветом. (Б) Показаны сигнальный пептид, IgV домены, IgC домены, трансмембранный домен и внутриклеточный участок короткой и длинной изоформы В7-Н3. Консервативные цистеины отмечены звездочкой (*).

3.2 Экспрессия В7-Н3 мРНК в органах, тканях и клетках человека

Нозерн-блот с тканями человека показал, что В7-Н3 кодируется мРНК размером 4,1-кб и экспрессируется во многих тканях человека, включая сердце, печень, плаценту, простату, семенники, матку, поджелудочную железу, тонкий и толстый отделы кишечника. мРНК, кодирующая В7-Н3, также была найдена в головном мозге, скелетных мышцах, почках и легких (рис. 9А и 9Б). В7-Н3 мРНК также была обнаружена в нескольких лимфоидных органах, в том числе в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, эмбриональной печени и тимусе (рис. 9В). Однако В7-Н3 мРНК не была обнаружена в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) (рис. 9В). Несколько линий опухолевых клеток, в том числе клетки меланомы G361, аденокарциномы шейки матки HeLa S3, хронической миелоидной лейкемии K562, карциномы легких A546 и колоректальной аденокарциномы SW480, также экспрессируют В7-Н3 мРНК (рис. 9Г). Другие клеточные линии лимфоидного происхождения Molt-4 (лимфобластный лейкоз) и Раджи (лимфома Беркитта) не имеют В7-Н3 мРНК. Равные количества мРНК, кодирующей β -актин, были обнаружены во всех образцах клеток и тканей (данные не представлены). Наличие В7-Н3 мРНК было подтверждено с помощью ПЦР в K562, U937, ТНР-1 и дендритных клетках, но не в Raji, Jurkat или Molt-4 клетках (данные не представлены).

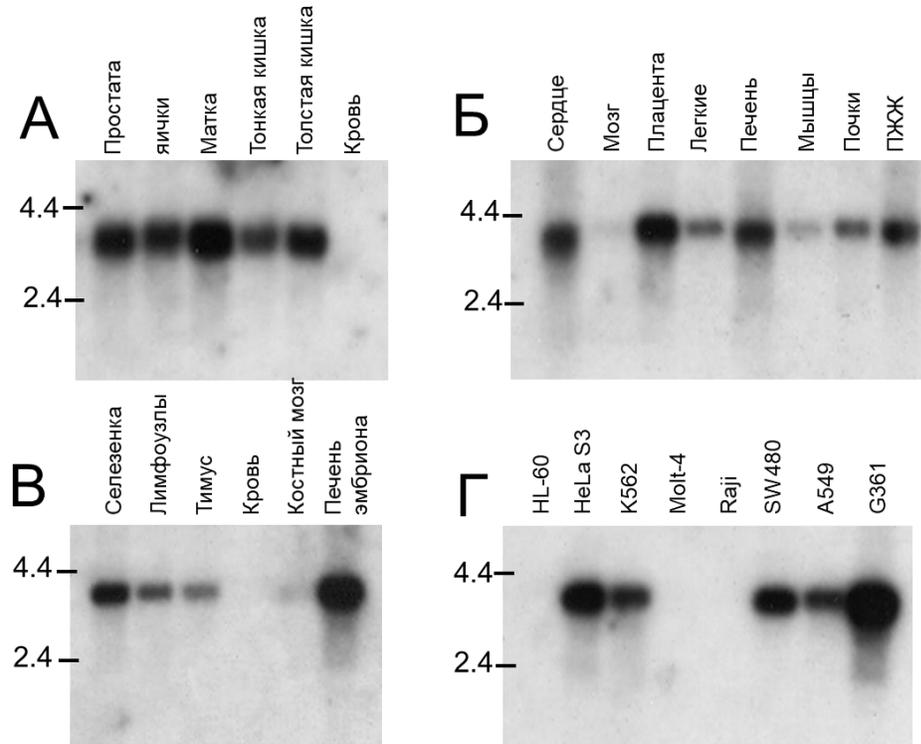


Рисунок 9. Нозерн-блот анализ V7-N3 мРНК. Общая РНК была выделена из тканей человека (А, Б и В) и опухолевых клеток (Г). Каждая дорожка содержит 1 мкг мРНК. Молекулярные маркеры указаны в 1000 н.о. V7-N3 кДНК использовалась в качестве зонда.

3.3 Экспрессия V7-N3 на поверхности клеток иммунной системы

Для анализа экспрессии белка V7-N3 использовались сыворотки, которые были получены путем иммунизации мышей гидрофильным пептидом из внеклеточной части молекулы V7-N3, конъюгированным с гемоцианином моллюска фиссурелли (keyhole limpet hemocyanin (KLH)). С помощью проточной цитометрии было показано, что сыворотки взаимодействуют с 293 клетками, которые экспрессируют V7-N3 (рис. 10), но не с V7-N1, V7-N2 или V7-1. Это говорит о том, что сыворотки специфически взаимодействуют с V7-N3.

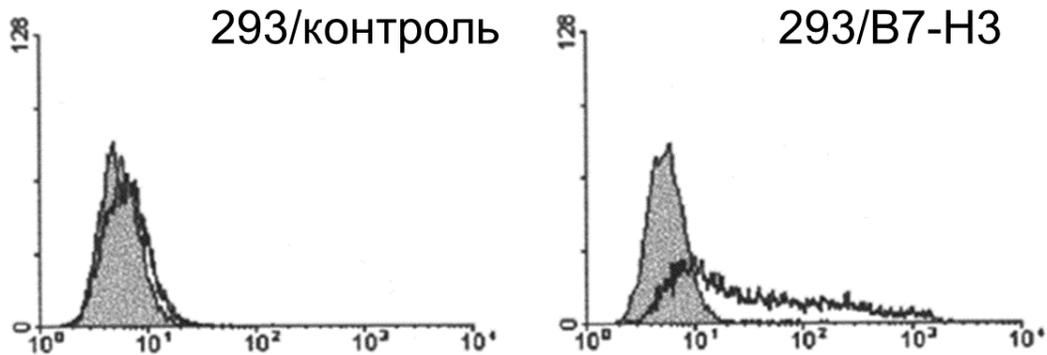


Рисунок 10. Детекция В7-Н3 на поверхности клеток с помощью иммунных сывороток. Клетки инкубировали с иммунными сыворотками против В7-Н3 (незаполненная гистограмма) или контрольными сыворотками (серая гистограмма) плюс FITC-конъюгированные антитела против мышиного IgG. Гистограммы отражают уровень интенсивности свечения по FL1 293Т клеток, трансфицированных контрольной плазмидой (293/контроль) или плазмидой, кодирующей В7-Н3 (293/В7-Н3).

С использованием полученных сывороток было определено, что В7-Н3 не экспрессируется на поверхности нестимулированных CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺ и дендритных клеток. Однако инкубация CD14⁺ макрофагов и дендритных клеток с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)) и IFN- γ соответственно, индуцировала экспрессию В7-Н3 на поверхности этих клеток. Активация CD3⁺ Т-лимфоцитов с ФМА и иономицином, но не с ФГА, индуцировала экспрессию В7-Н3 (рис. 11). Также обработка с ФМА + ionomycin, но не с ЛПС вызывала экспрессию В7-Н3 на поверхности U937 (клеточная линия человеческих моноцитов). CD19⁺ В лимфоциты не экспрессировали В7-Н3 даже после стимуляции с высокими дозами ЛПС или комбинацией ФМА и иономицина. Экспрессия В7-Н3 не была обнаружена на клеточных опухолевых линиях, таких как хориокарцинома BeWo, аденокарцинома HT29, WiDr и SW620, стимулированных с ФМА и иономицина (данные не представлены). Таким образом, в ходе экспериментов было

показано, что В7-Н3 экспрессируется на поверхности дендритных клеток, моноцитов и Т-лимфоцитов только после их активации.

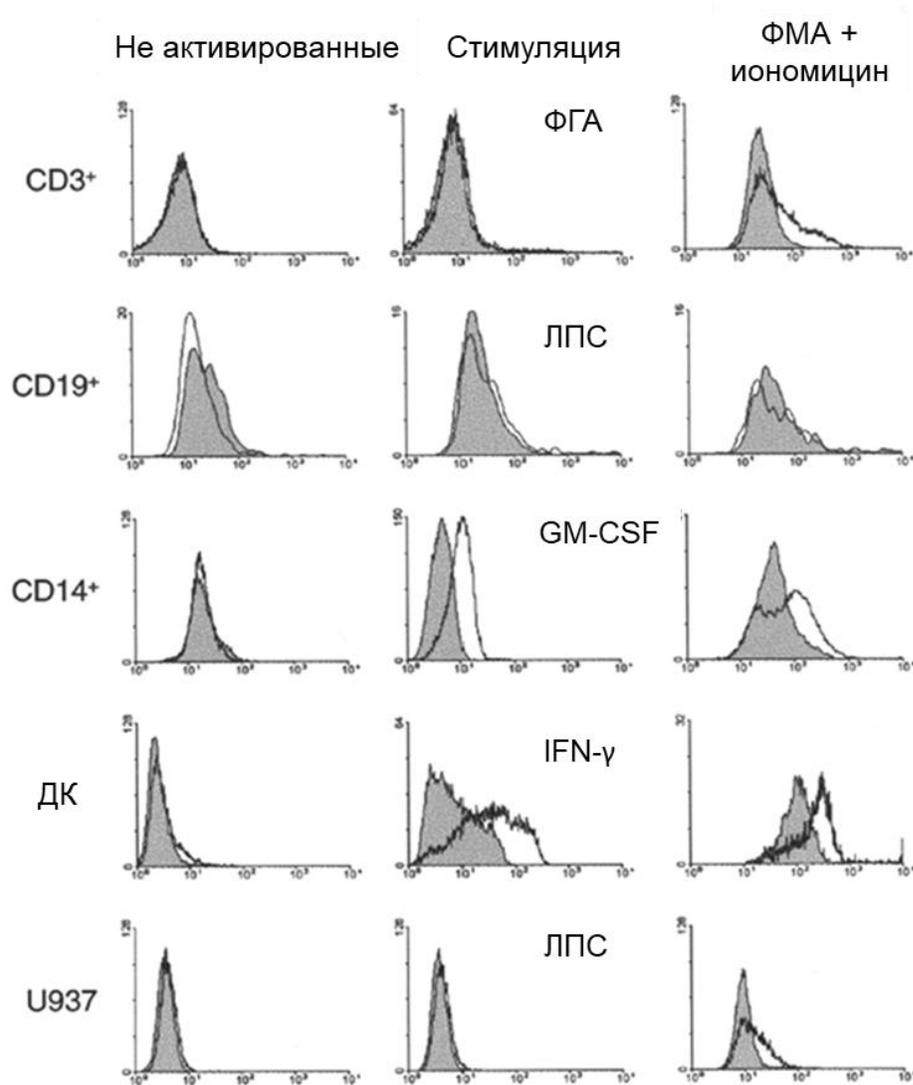


Рисунок 11. Анализ экспрессии В7-Н3 с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали с иммунными сыворотками, как описано в рис. 10. Уровень интенсивности флуоресценции для нестимулированных CD3⁺ Т-лимфоцитов; CD19⁺ В-клеток; CD14⁺ моноцитов, дендритных клеток и U937 клеток (левые гистограммы), те же клетки, инкубированные с указанными физиологическими стимуляторами (центральные гистограммы), или клетки, инкубированные с комбинацией ФМА и иономицин (правые гистограммы).

3.4 Предполагаемый В7-Н3 рецептор экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах

Для того чтобы определить, на каких клетках экспрессируется предполагаемый рецептор, взаимодействующий с В7-Н3, был создан химерный рекомбинантный белок В7-Н3Ig, где внеклеточная часть молекулы В7-Н3 была соединена с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина IgG1. Результаты проточной цитометрии показывают, что неактивированные Т-лимфоциты не экспрессируют рецептор, взаимодействующий с В7-Н3 (рис. 12). Однако стимуляция Т-лимфоцитов с ФГА в течение 24 ч приводила к экспрессии В7-Н3 рецептора, которая исчезала к 48 часам после начала стимуляции (рис. 12). Сходные уровни экспрессии В7-Н3 были также обнаружены на CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитах (рис. 13). В7-Н3Ig не взаимодействовал с другими клеточными популяциями, такими как NK-клетки, В-клетки и макрофаги. Таким образом, наши результаты говорят о временной экспрессии рецептора В7-Н3 на ранних сроках активации Т-лимфоцитов.

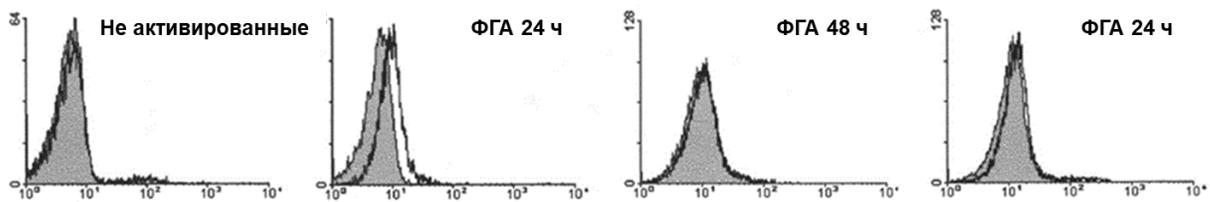


Рисунок 12. Взаимодействие В7-Н3Ig с активированными Т-лимфоцитами. Т-клетки, выделенные из периферической крови, культивировались с ФГА (5 мкг/мл). Через 24, 48 или 72 часа после начала инкубации Т-клетки были окрашены В7-Н3Ig (незаполненные гистограммы) или контрольным Ig (серые гистограммы).

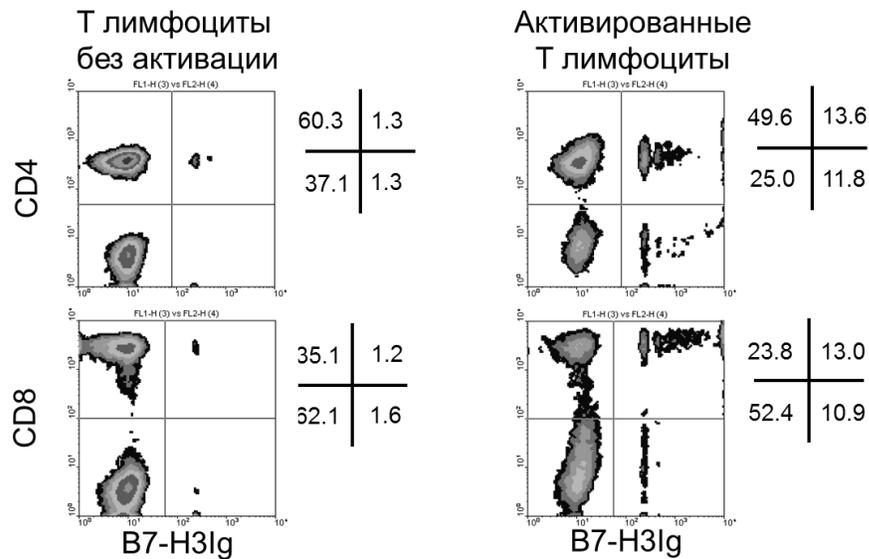


Рисунок 13. Взаимодействие B7-H3Ig с CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами. Неактивированные (левые панели) или ФГА-активированные Т-лимфоциты (правые панели) красили с B7-H3Ig и МАТ против CD3, CD4 и CD8 молекул. Клетки гейтировали по экспрессии CD3 в популяции лимфоцитов и определяли взаимодействие B7-H3Ig с CD4⁺ (верхние панели) или CD8⁺ (нижние панели) Т-лимфоцитами.

3.5 Взаимодействие B7-H3 с известными рецепторами B7 лигандов

Ранее было показано, что CTLA-4, ICOS и PD-1 экспрессируются на поверхности Т-лимфоцитов после активации, в то время как CD28 экспрессируется на наивных Т-клетках. Для того, чтобы проверить, связывается ли B7-H3 с известными рецепторами B7 лигандов, такими как CTLA-4, ICOS и PD-1, клетки 293 трансфицировали рекомбинантной плазмидой, кодирующей B7-H3, и экспрессию определяли с помощью проточной цитометрии, используя CTLA-4Ig, ICOSIg и PD-1Ig химерными рекомбинантными белками и вторичные флуоресцентные МАТ против Ig. В качестве положительного контроля клетки 293 после трансфекции B7-H3 плазмидой анализировались с использованием иммунных сывороток против B7-H3 с помощью проточной цитометрии (рис. 14). Ни один из тестируемых рекомбинантных химерных белков (CTLA-4Ig, ICOSIg и PD-1Ig) не взаимодействовал с 293 клетками

трансфицированными В7-Н3. Более того, сыворотка против В7-Н3 не связывалась с 293 клетками, трансфицированными В7-1, В7-Н1 или В7-Н2 рекомбинантными плазмидами, хотя эти клетки взаимодействовали с CTLA-4Ig, ICOSIg и PD-1Ig соответственно (Рис. 14). Был сделан вывод, что потенциальный рецептор для В7-Н3 лиганда экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и отличается от CTLA-4, ICOS и PD-1.

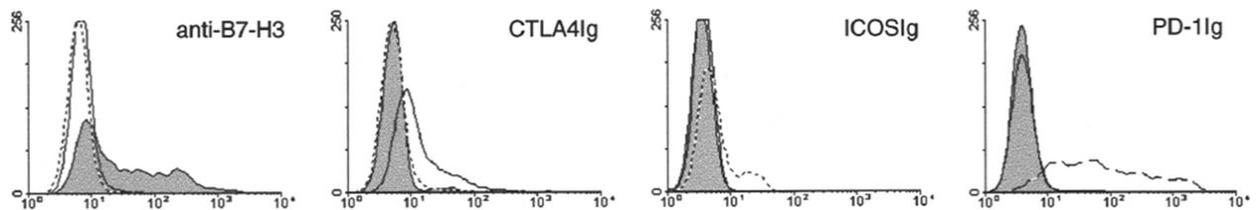


Рисунок 14. Взаимодействие В7-Н3 с CTLA-4, ICOS и PD-1. 293 клетки, трансфицированные В7-Н3 (серые гистограммы), В7-1 (незаполненные гистограммы), В7-Н1 (точечная линия) или В7-Н2 (пунктирная линия), были окрашены с сыворотками против В7-Н3 (первая гистограмма), CTLA-4Ig (вторая гистограмма), ICOSIg (третья гистограмма) или PD-1Ig (четвертая гистограмма).

3.6 В7-Н3 молекула костимулирует Т-клеточный ответ

Для изучения влияния В7-Н3 на функцию Т-клеток очищенные Т-лимфоциты инкубировали с МАТ против CD3 молекулы иммобилизованными на поверхности 96-луночных планшетов в присутствии также иммобилизованного рекомбинантного белка В7-Н3Ig. Пролиферацию Т-клеток определяли, используя радиоактивный тимидин ($[^3\text{H}]\text{-TdR}$). В присутствии субоптимальной дозы анти-CD3 МАТ и В7-Н3Ig отмечалось усиление пролиферации Т-лимфоцитов (рис. 15А), хотя В7-1Ig, рекомбинантный белок классической костимуляторной молекулы, вызывал значительно более высокую пролиферацию Т-лимфоцитов (рис. 15А). В отсутствие анти-CD3 МАТ ни В7-Н3Ig, ни В7-1Ig не усиливали пролиферации Т-клеток (данные не

представлены). Иммуобилизованный В7-Н3Ig усиливал пролиферацию как CD4+, так и CD8+ Т-клеток (рис. 15Б).

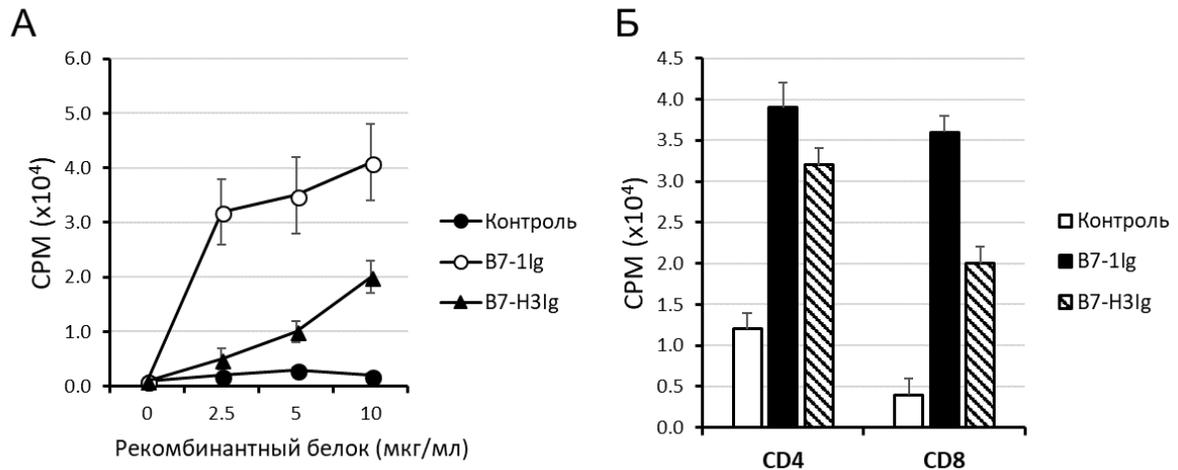


Рисунок 15. В7-Н3 костимулирует TCR-опосредованную пролиферацию Т-лимфоцитов. (А) Т-клетки культивировались в плоскодонном 96-луночном планшете с иммобилизованными МАТ против CD3 (40 нг/мл) и указанными концентрациями В7-1Ig, В7-Н3Ig или контрольных Ig. (Б) CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, очищенные с помощью магнитных частиц, инкубировались с иммобилизованными МАТ антителами против CD3 (40 нг/мл) + В7-1Ig, В7-Н3Ig или контрольными Ig (10 мкг/мл) в 96-луночных планшетах. После 48 ч инкубации в лунки добавляли ³H-тимидин (1 µCi/well) и культивировали еще 24 ч.

3.7 Эффект В7-Н3 на цитотоксические Т-лимфоциты

Чтобы оценить участие В7-Н3 в генерации ЦТЛ очищенные Т-лимфоциты человека инкубировали с клетками линии меланомы 624mel, которые были трансфицированы рекомбинантной плазмидой, кодирующей В7-Н3, или контрольным вектором. Экспрессия В7-Н3 на поверхности трансфицированных клеток была подтверждена с помощью проточной цитометрии (рис. 16А). Активность ЦТЛ определяли путем лизиса 624mel клеток, меченных радиоактивным ⁵¹Cr. Было показано, что 624mel клетки,

экспрессирующие В7-Н3 на поверхности (рис. 16А), индуцируют ЦТЛ (рис. 16Б). Таким образом, наши результаты показывают, что В7-Н3 может костимулировать пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и генерацию ЦТЛ *in vitro*.

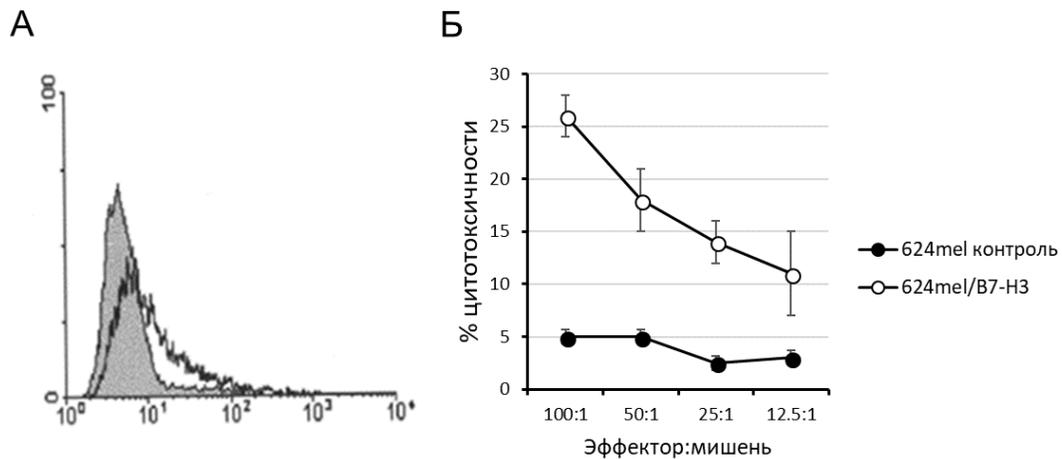


Рисунок 16. В7-Н3 усиливает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов. (А) Клетки меланомы 624mel, трансфицированные рекомбинантной плазмидой, кодирующей В7-Н3 (серые гистограммы), или контрольной плазмидой, были окрашены с иммунными сыворотками против В7-Н3, как описано в рис 10. (Б) Т-клетки инкубировали 96 часов с 624mel клетками, экспрессирующими В7-Н3, или контрольными клетками. Цитотоксическая активность тестировалась с помощью стандартного теста высвобождения ⁵¹[Cr].

3.8 В7-Н3 селективно индуцирует продукцию IFN- γ

Эффект В7-Н3 костимуляции на продукцию цитокинов анализировали с помощью GEArray мембраны для скринирования экспрессии мРНК, кодирующих различные цитокины. РНК выделяли из Т-лимфоцитов, которые культивировались в течение 24 ч в присутствии анти-CD3 МАТ и контрольных Ig или В7-Н3Ig. мРНК переводили в кДНК с помощью обратной транскриптазы, метили радиоактивным ³²P и гибридизовали на GEArray мембране, на которую нанесены специфические ДНК пробы для интерлейкинов 1-18 (IL-1 ... IL-18),

IFN- γ , TNF- α и TNF- β . Интенсивность сигнала для каждой пробы, провзаимодействовавшей с ^{32}P меченой кДНК, определяли с помощью фосфоимеджера (Molecular Dynamics, США). Экспрессия каждого цитокина калибровалась относительно интенсивности сигнала для мРНК, кодирующей β -актин (которая была принята за одну условную единицу). Уровень экспрессии мРНК цитокинов выражали в условных единицах. Так как GEAarray – полуколичественный метод, трехкратное увеличение сигнала относительно контроля считалось значительным увеличением экспрессии РНК, кодирующей цитокины. Т-клетки, инкубированные с субоптимальной дозой anti-CD3 МАТ и В7-Н3Ig, экспрессировали в 18 раз больше мРНК IFN- γ в сравнении с контрольной группой (рис. 17А). Небольшое, но, возможно, значительное увеличение экспрессии мРНК, кодирующей IL-8 и TNF- α , было также обнаружено в Т-лимфоцитах, инкубированных в присутствии анти-CD3 МАТ и В7-Н3Ig. Также с использованием ИФА было подтверждено, что Т-лимфоциты продуцируют увеличенное количество IFN- γ при стимуляции их анти-CD3 + В7-Н3Ig (рис. 17 Б и В). В дополнение, Т-лимфоциты, инкубированные с 293 клетками, экспрессирующими В7-Н3, секретировали значительно больше IFN- γ в сравнении с контролем. Таким образом, полученные результаты говорят о том, что костимуляция через В7-Н3 молекулу селективно повышает продукцию IFN- γ .

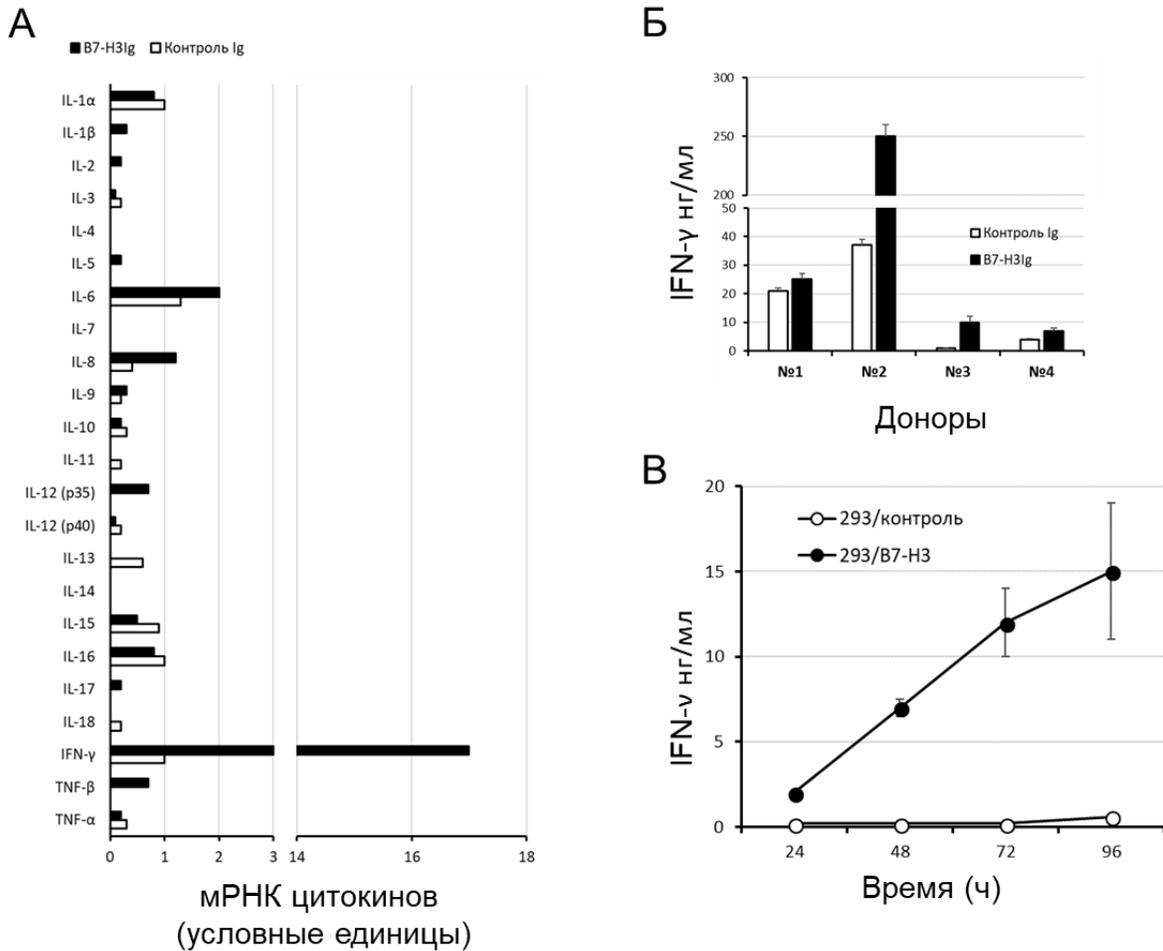


Рисунок 17. B7-H3 усиливает продукцию IFN- γ . (А) Т-лимфоциты периферической крови, очищенные с помощью магнитных частиц, инкубировали (5×10^6 клеток/лунку) в 24-луночных планшетах с иммобилизованными анти-CD3 МАТ (40 нг/мл) с B7-H3Ig или контрольными Ig (10 мкг/мл). После 24 ч инкубации из клеток выделяли РНК, которую переводили в кДНК с использованием реверс-транскриптазы в присутствии α - ^{32}P -dCTP. Меченые кДНК гибридизировали на GEArray мембранах. Уровни мРНК, кодирующие цитокины, выражались в условных единицах пропорционально мРНК, кодирующей β -актин. Результаты одного из двух независимых экспериментов показаны. (Б) Т-клетки (5×10^6 клеток/лунку), обогащенные с использованием волокон нейлона, культивировались в 24-луночных планшетах с иммобилизованными анти-CD3 МАТ (40 нг/мл) с B7-H3Ig или контрольными Ig (10 мкг/мл). Супернатанты собирали после 24 ч инкубации и концентрацию IFN- γ измеряли с помощью ИФА. (В) Мононуклеарные клетки периферической крови (5×10^6 клеток/лунку) инкубировались с облученными НЕК293Т клетками, трансфицированными родительской pcDNA3.1 (–) плазмидой (293/контроль) или B7-H3 pcDNA вектором (293/B7-H3). Супернатанты собирались в указанные точки времени, и концентрацию IFN- γ измеряли с помощью ИФА.

3.9 Исследование корреляции между экспрессией В7-Н3 и продукцией IFN- γ

Для того, чтобы определить роль В7-Н3 молекулы во взаимодействии Т-лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками, дендритные клетки обрабатывали антисмысловыми олигонуклеотидами (antisense oligonucleotides (AS)) для блокировки экспрессии В7-Н3. Дендритные клетки, обработанные AS, были использованы для стимуляции аллогенных Т-лимфоцитов. Снижение экспрессии В7-Н3 на поверхности антигенпрезентирующих клеток, обработанных комбинацией AS-1 и AS-2, было зафиксировано с использованием проточной цитометрии (рис. 18А). Т-лимфоциты, культивированные с дендритными клетками, обработанными с AS-1+AS-2, продуцировали значительно меньше IFN- γ по сравнению с контролем (рис. 18Б). Контрольные олигонуклеотиды, а также AS-1 или AS-2 по отдельности не влияли на экспрессию В7-Н3 и продукцию IFN- γ . Из этого следует, что В7-Н3 играет ключевую роль в продукции IFN- γ Т-лимфоцитами при взаимодействии с АПК.

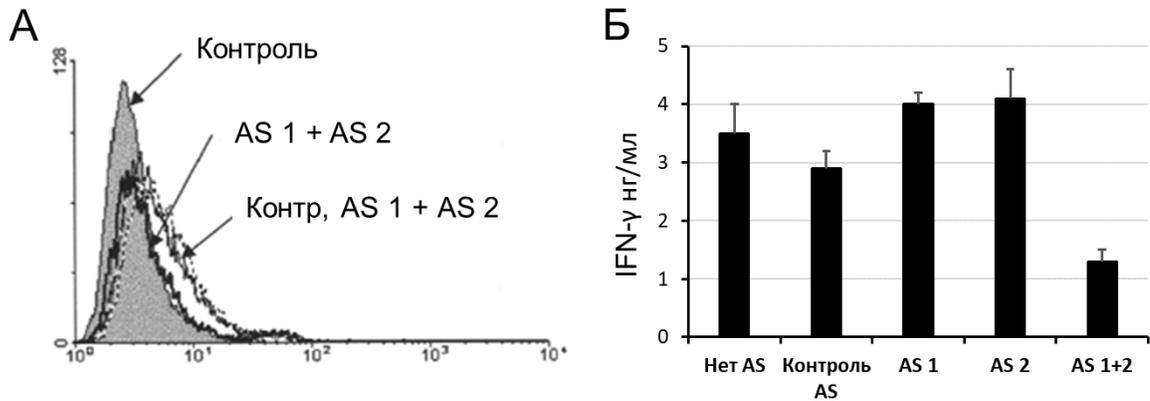


Рисунок 18. Снижение В7-Н3 экспрессии после обработки дендритных клеток с В7-Н3 антисмысловыми комплементарными олигонуклеотидами уменьшает продукцию IFN- γ Т-лимфоцитами. (А) Анализ экспрессии В7-Н3 на ДК. Дендритные клетки активировали с IFN- γ и обрабатывали с контрольными олигонуклеотидами (тонкая линия), AS-1 (точечная линия), AS-2 (пунктирная линия) или AS-1 + AS-2 (толстая линия). (Б) Т-клетки инкубировали с ДК, обработанными с олигонуклеотидами. Супернатанты собирали через 48 ч после начала инкубации и определяли концентрацию IFN- γ с помощью ИФА. Результаты одного из двух независимых экспериментов показаны. (* – $P < 0,05$)

3.10 Эффект мышинной В7-Н3 молекулы на костимуляцию Т-лимфоцитов

Для того чтобы изучить эффект В7-Н3 *in vivo* на мышинной модели, сначала было проверено, вызывает ли мышинная молекула В7-Н3 костимуляцию гомологичных Т-лимфоцитов. Из результатов, представленных на рис. 19, видно, что рекомбинантный белок В7-Н3Ig, сконструированный из внеклеточной части мышинной В7-Н3 и Fc-фрагмента мышинового IgG2a, усиливает пролиферацию мышинных Т-лимфоцитов (рис. 19А) и продукцию IFN- γ (рис. 19Б) в ответ на субоптимальную стимуляцию с анти-CD3 МАТ. При этом костимуляторный эффект был дозозависимым. Контрольный Fc-фрагмент мышинового IgG2a (Ig) не влиял на пролиферацию и продукцию IFN- γ Т-клетками. Таким образом, мышинный гомолог В7-Н3 имеет сходную костимуляторную функцию с человеческой молекулой.

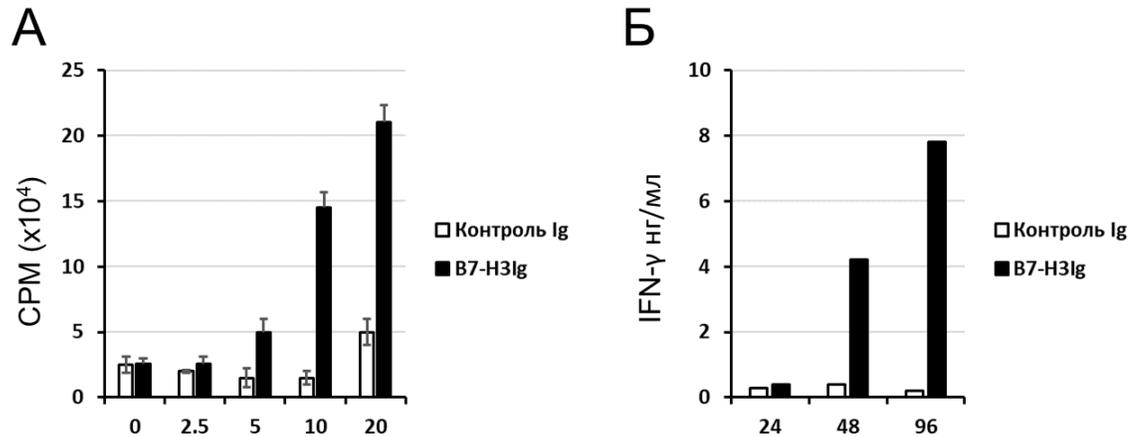


Рисунок 19. В7-Н3 костимулирует Т-клеточный ответ у мышей. Анти-CD3 МАТ индуцированная пролиферация (А) и продукция IFN- γ (Б) мышинными Т-лимфоцитами, инкубированными в присутствии В7-Н3Ig (черные столбики) или контрольного Ig (белые столбики).

3.11 Формирование стабильных клонов Р815 опухоли, экспрессирующих В7-Н3

Клетки мастоцитомы Р815 были трансфицированы кДНК, кодирующей мышиную В7-Н3. Три клона трансфицированных клеток Е3, Е6 и D11 были выбраны для дальнейших экспериментов. С использованием МАТ против мышинной В7-Н3 молекулы было продемонстрировано, что дикий тип клеток и клетки, трансфицированные контрольной плазмидой, не экспрессируют В7-Н3 на клеточной поверхности, в то время как все три клона, трансфицированные плазмидой В7-Н3, показали высокий уровень экспрессии (рис. 20). При этом все три трансфицированных клона продемонстрировали одинаковый уровень пролиферации *in vitro*: такой же, как и контрольные клеточные линии. И, наконец, все клеточные линии экспрессировали одинаковый уровень МНС I и лизировались Р1А специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) (результаты не представлены). В большинстве экспериментов, описанных ниже, использовался клон Е3 Р815 опухолей, экспрессирующих В7-Н3 белок на поверхности.

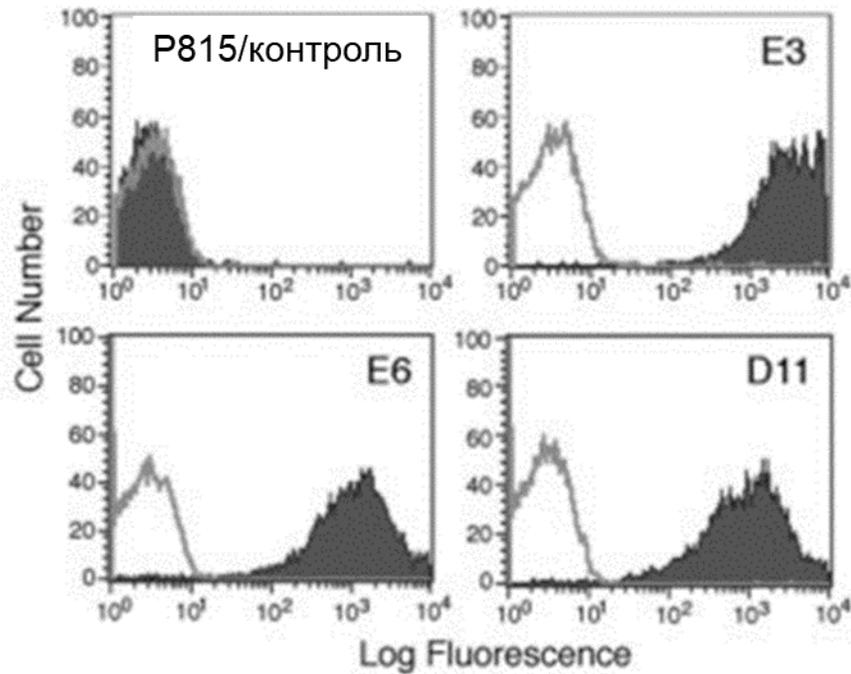


Рисунок 20. Экспрессия мВ7-Н3 на трансфицированных опухолевых клетках. Р815 клетки были трансфицированы плазмидой, кодирующей мВ7-Н3, или контрольной плазмидой. Стабильные клоны трансфицированных клеток были окрашены с 9С11 МАТ и антителами против IgG хомяков, конъюгированных с флуоресцентной меткой PE, и исследованы с помощью проточной цитометрии.

3.12 Эффект В7-Н3 экспрессии на рост опухолей *in vivo*

Для определения роста опухолей *in vivo* DBA/2 мышам подкожно имплантировали контрольные Р815 клетки или Р815, экспрессирующий В7-Н3. У всех мышей, получивших инъекцию контрольных клеток, были обнаружены быстро растущие опухоли. Однако скорость роста Р815, экспрессирующей В7-Н3, была значительно снижена. В дополнение, 44 % экспериментальных животных оторгли Р815 В7-Н3 опухоли через несколько недель после имплантации (рис. 21А). Аналогичные результаты были получены для других клонов Р815, экспрессирующих В7-Н3 молекулу. Выживаемость мышей, инокулированных с Р815 В7-Н3 клетками, также была повышенной. Однако, когда Р815 В7-Н3 инокулировали в иммунодефицитных мышей BALB/c nu/nu,

контрольные опухоли и опухоли, экспрессирующие В7-Н3, росли с одинаковой скоростью (рис. 21Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия В7-Н3 усиливает иммуногенность мастоцитомы Р815.

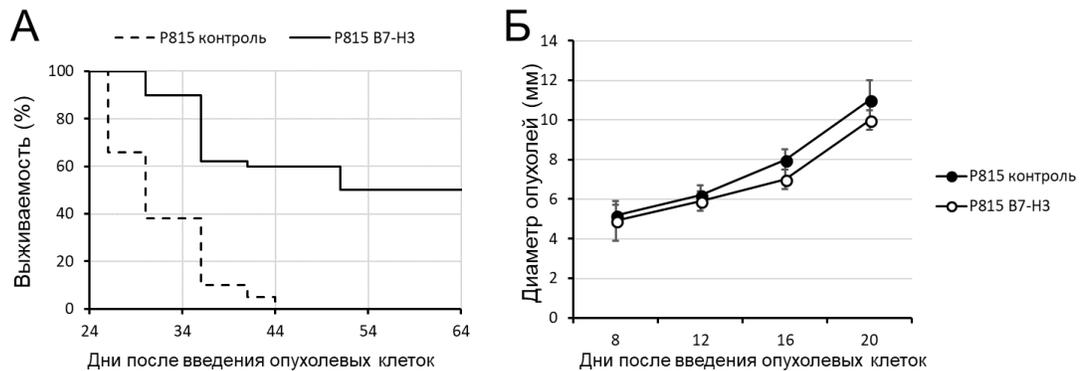


Рисунок 21. Трансфекция В7-Н3 снижает скорость роста сингенных опухолей у иммунокомпетентных мышей. DBA/2 (А) или BALB/c *nu/nu* (Б) мыши получали инъекцию контрольных Р815 опухолевых клеток или Р815, экспрессирующих В7-Н3. Выживаемость мышей (А) наблюдали ежедневно, диаметр опухолей (Б) измеряли раз в 4 дня.

3.13 Клеточные механизмы отторжения опухолей, экспрессирующих В7-Н3

Для того, чтобы определить клеточные механизмы отторжения опухолей, экспрессирующих В7-Н3, мышам DBA/2 вводили Е3 клетки и антитела против CD4, CD8 или NK-клеток. Инъекция антител против CD4 или NK-клеток не имела значимого эффекта на рост Е3 клеток. Однако МАТ против CD8 полностью снимали резистентность мышей к росту опухоли, экспрессирующей В7-Н3. Все мыши погибли в течение 30 дней (рис. 22А). Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что CD8 клетки играют ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе, регулируемом В7-Н3 молекулой. Более того, мыши, которые отторгли Р815 опухоли, экспрессирующие В7-Н3, были резистентны к повторной инокуляции клеток дикого типа линии Р815 (рис. 22Б) и показали повышенный уровень активности ЦТЛ, способных лизировать

клетки P815 (рис. 22В), что говорит о развитии специфической иммунологической памяти против опухоли P815. У мышей, не получавших инъекцию P815 клеток, экспрессирующих B7-H3, инокуляция родительских P815 клеток приводила к росту опухолей без генерации опухолеспецифических ЦТЛ (рис. 22Б и 21В).

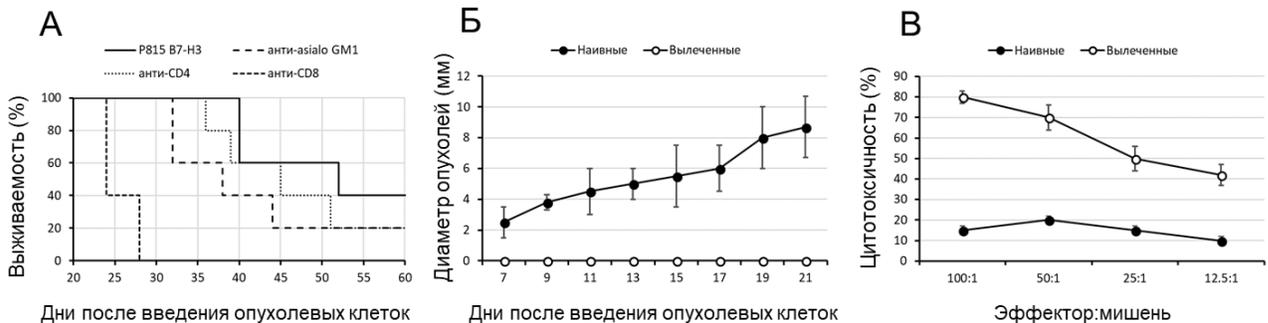


Рисунок 22. Экспрессия B7-H3 на P815 клетках усиливает опухолеспецифический ЦТЛ ответ. (А) DBA/2 мышам вводили P815 B7-H3 клеток, мыши также получали инъекцию МАТ против CD4, CD8 или asialo GM1 на 1, 7 и 14 день. Выживаемость мышей контролировали каждый день. (Б), Мышам, которые отторгли P815 B7-H3 опухоли (○) повторно, вводили P815 клетки через 60 дней после первичной инъекции опухолевых клеток. DBA/2 мыши без предварительных инъекций (●) служили в качестве контроля. (В) Цитотоксическая активность спленоцитов, полученных от мышей, которые отторгли вторичные инъекции P815, измерялась с использованием стандартного теста высвобождения радиоактивного ^{51}Cr .

Роль опухолеспецифических CD8⁺ ЦТЛ также была подтверждена с использованием P1 TCR трансгенных мышей. CD8 клетки этих мышей экспрессируют TCR специфический для P1A антиген, который присутствует в P815 опухолях и представлен в контексте H-2L^d МНС. Нами был проведен адоптивный перенос спленоцитов (10^6 клеток) от мышей P1 в мышей F1 (DBA/2 x BALB/c), которые также получили инокуляцию клеток P815 или P815 B7-H3. У мышей, получивших инъекцию P1 спленоцитов и P815 клеток дикого типа, наблюдалось развитие летальных опухолей, в то время как P815 B7-H3 клетки

отторгались, и мыши жили более 40 дней после инокуляция опухолевых клеток (рис. 23А и 23Б), однако наблюдался временный рост опухолей в первые дни после инокуляции. Использование адоптивного переноса P1 лимфоцитов позволило нам разработать модель для детального исследования роли В7-Н3 опосредованной костимуляции *in vivo*.

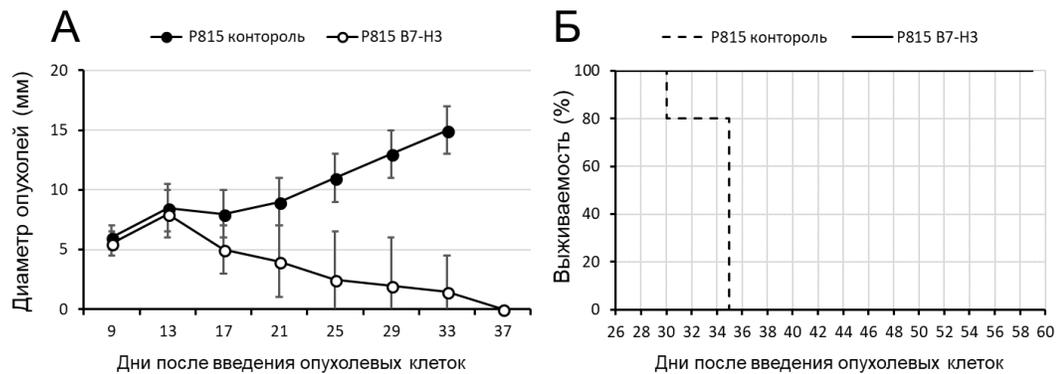


Рисунок 23. Экспрессия В7-Н3 усиливает активность опухолеспецифических CD8 Т-лимфоцитов. В6хD2F1 мышам вводили *i.v.* 1×10^6 спленоцитов от P1 TCR трансгенных мышей. Эти мыши в тот же день получали *s.c.* инъекцию 1×10^6 Р815 контроль (●) или Р815 В7-Н3 клеток (○). Размер опухолей (А) и выживаемость мышей (Б) фиксировали 2-3 раза в неделю в течение эксперимента.

3.14 Эффект В7-Н3 на пролиферацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vivo*

С использованием адоптивного переноса P1-ЦТЛ была исследована роль В7-Н3 в пролиферации опухолеспецифических лимфоцитов. F1 мышам, получавшим инъекцию Р815 В7-Н3 клеток, вводили P1А-ЦТЛ, обработанных CFCE. На 2, 3 и 5 день после введения P1А-ЦТЛ клетки селезенки и лимфоузлов, дренирующих опухоли, исследовались на уровень интенсивности CFCE флюоресценции (индикатор количества циклов пролиферации). На 2 день пролиферация ЦТЛ не наблюдались, но на 3 день регистрировалась значительная пролиферация P1А-специфических ЦТЛ в селезенке и лимфоузлах мышей с Р815 В7-Н3 опухолями. Значительная пролиферация

лимфоцитов также регистрировалась в лимфоузлах, дренирующих родительские Р185, хотя опухоли, экспрессирующие В7-Н3, вызывали более сильную пролиферацию. На 5 день после инокуляции опухолей большинство Р1А-специфических ЦТЛ прошли по крайней мере один цикл пролиферации у мышей с опухолями Р815 В7-Н3, в то время как некоторые Р1А специфические ЦТЛ оставались неактивированными у Р815 мышей (рис. 24). Таким образом, полученные результаты говорят о том, что В7-Н3 стимулирует деление опухолеспецифических ЦТЛ в лимфоидных органах, что может приводить к усилению противоопухолевого иммунного ответа.

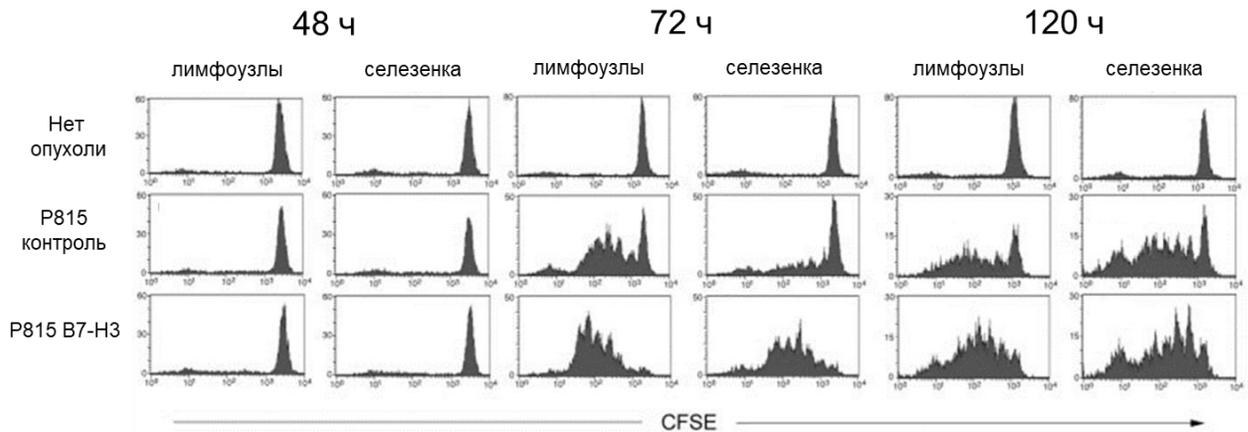


Рисунок 24. P815 клетки, экспрессирующие В7-Н3, индуцируют пролиферацию опухолеспецифических ЦТЛ *in vivo*. C57xD2F1 мышам вводили s.c. 1×10^6 P815 или P815 В7-Н3 клеток. На 6 день мыши получали i.v. инъекцию очищенных CD8⁺ Р1А ЦТЛ, меченных с CFSE. Лимфоузлы, дренирующие опухоли и селезенки, собирали на 2, 3 и 5 день после введения ЦТЛ. Клетки красили с Р1А/Н-2d димером и CD8 МАТ конъюгированные с CyChrome для гейтирования, деление клеток определяли с помощью проточной цитометрии.

3.15 Эффект В7-Н3 на пролиферацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro*

Аналогично с эффектом на пролиферацию лимфоцитов *in vivo* Р815 клетки, экспрессирующие В7-Н3, также увеличивали пролиферацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro* (рис. 25А и 25Б). В дополнение В7-Н3, экспрессирующие Р815 опухоли, значительно усиливали цитотоксическую активность Р1А-ЦТЛ (рис. 25В). Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что В7-Н3 способствует активации Т-лимфоцитов, что приводит к усилению пролиферации и цитотоксической активности.

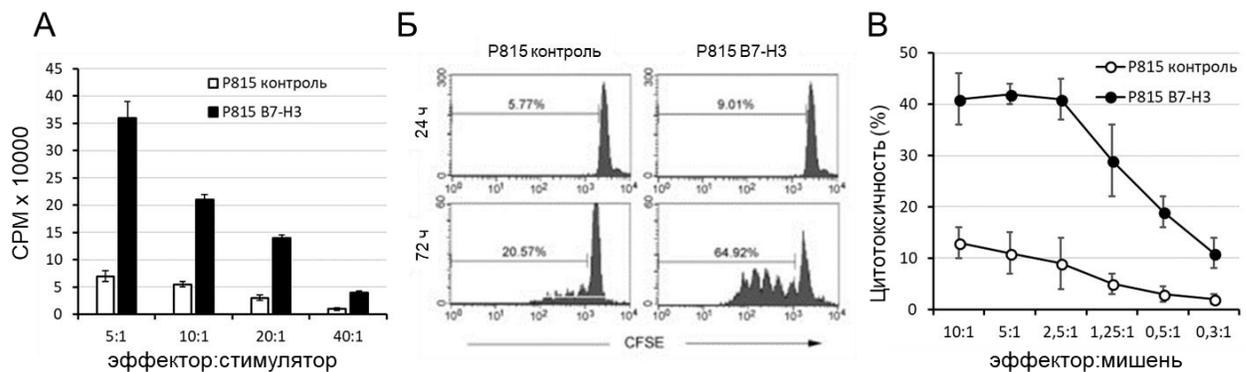


Рисунок 25. Р815 клетки, экспрессирующие В7-Н3, индуцируют пролиферацию опухолеспецифических ЦТЛ *in vitro*. (А) Очищенные CD8⁺ Р1А ЦТЛ культивировали с облученными Р815 или Р815 В7-Н3 клетками в указанной пропорции (эффектор/стимулятор) в течение 48 ч. Пролиферацию Т-клеток определяли с помощью включения [³H]TdR. (Б) Очищенные CD8⁺ Р1А ЦТЛ клетки метили с CFSE, стимулировали с облученными Р815 или Р815 В7-Н3 клетками в соотношении 1:20 (эффектор:стимулятор), деление клеток в 1 и 3 день анализировали с помощью проточной цитометрии. (В) ЦТЛ активность измеряли с помощью стандартного теста высвобождения ⁵¹Cr.

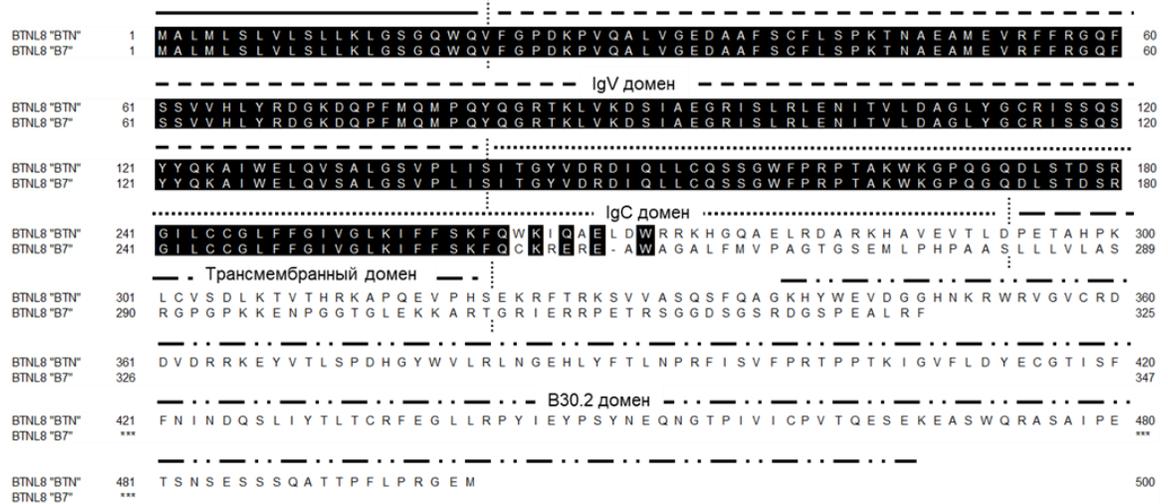
3.16 Клонирование и характеристика BTNL8

С использованием последовательностей внеклеточной части описанных молекул семейства В7 был произведен поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей в открытых и частных базах данных. Было найдено множество мРНК и EST, кодирующих предполагаемый белок, сходный с молекулами семейства В7. Дальнейший биоинформационный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей показал, что молекула может быть идентифицирована как бутирофилиновый-аналог 8 (butyrophilin-like 8; BTNL8), зарегистрированный в NCBI (National Center for Biotechnology Information) базе данных как Hs.189109. Никакой информации о функции этой молекулы не было нами обнаружено в открытых источниках литературы и базах данных. Молекула BTNL8 соответствовала нуклеотидной последовательности NT 023133, локализованной на 5 хромосоме человека в позиции 5q35.3. Ген BTNL8, состоящий из 8 экзонов, достигал ~52 kb и содержал информацию для транскрипции короткой и длинной изоформы мРНК, кодирующей трансмембранный белок 1-го типа (рис. 26А). Используя BLAST (Basic local alignment search tool) алгоритм в NCBI базе данных для анализа экспрессии BTNL8 было определено, что мРНК, кодирующая эту молекулу, может присутствовать в различных тканях человеческого организма. При помощи ПЦР с последующим секвенированием были выявлены мРНК, кодирующие обе изоформы BTNL8 в образцах тканей человеческого кишечника. Обе изоформы BTNL8 имеют идентичную нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, внеклеточную часть (состоящую из IgV и IgC доменов), гидрофобный трансмембранный регион (рис. 26А), соответствующие экзонам 1-4 (рис. 26Б). Экзоны 5-8 кодировали внутриклеточную часть молекулы BTNL8. Было также обнаружено, что 4 экзон содержит участок альтернативного сплайсинга, который обуславливает транскрипцию мРНК, кодирующую длинную форму белка BTNL8 размером 500 а.о., который содержит В30.2 фрагмент, характерный для молекул

семейства бутирофилинов (рис. 26Б). РНК, кодирующая короткую форму белка, имеет участок 4-го экзона длиной 244 а.о., который приводит к изменению рамки считывания и возникновению стоп-кодона, в результате чего транскрибируется белок длиной 347 а.о. без В30.2 фрагмента. Таким образом, короткая форма белка BTNL8 представляет собой молекулу с характеристиками, присущими членам семейства В7 (рис. 26Б). Наличие В30.2 фрагмента в длинной изоформе белка BTNL8 говорит о его гомологии с другими членами семейства бутирофилинов (рис. 26Б).

Сравнение BTNL8 с молекулами семейства В7 (рис. 27) показало наличие консервативных цистеинов в IgV и IgC доменах, соответствующих таковым у других членов этого семейства. Внеклеточная часть BTNL8 имеет 22–27 % аминокислотных последовательностей, идентичных с членами семейства В7, и 30–40 %, идентичных с бутирофилиновыми молекулами.

А



Б

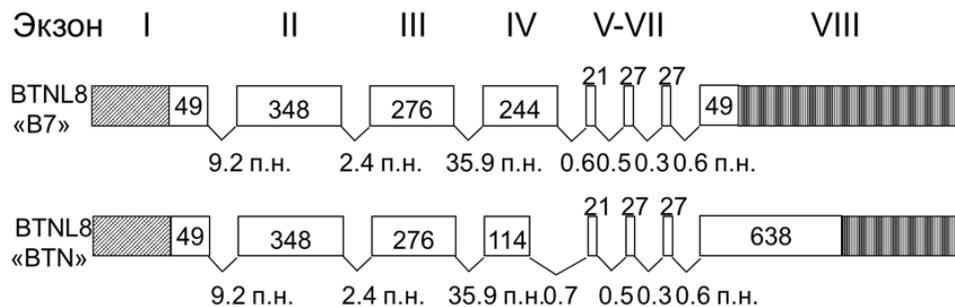


Рисунок 26. Сравнение аминокислотных последовательностей (А) и геномная организация (Б) двух изоформ BTNL8. Белые и заштрихованные прямоугольники обозначают кодирующие и некодирующие участки для двух изоформ BTNL8 соответственно. Цифры внутри или сверху прямоугольников обозначают количество нуклеотидов в каждом экзоне. Длина интронов указана под прямоугольниками, обозначающими экзоны.

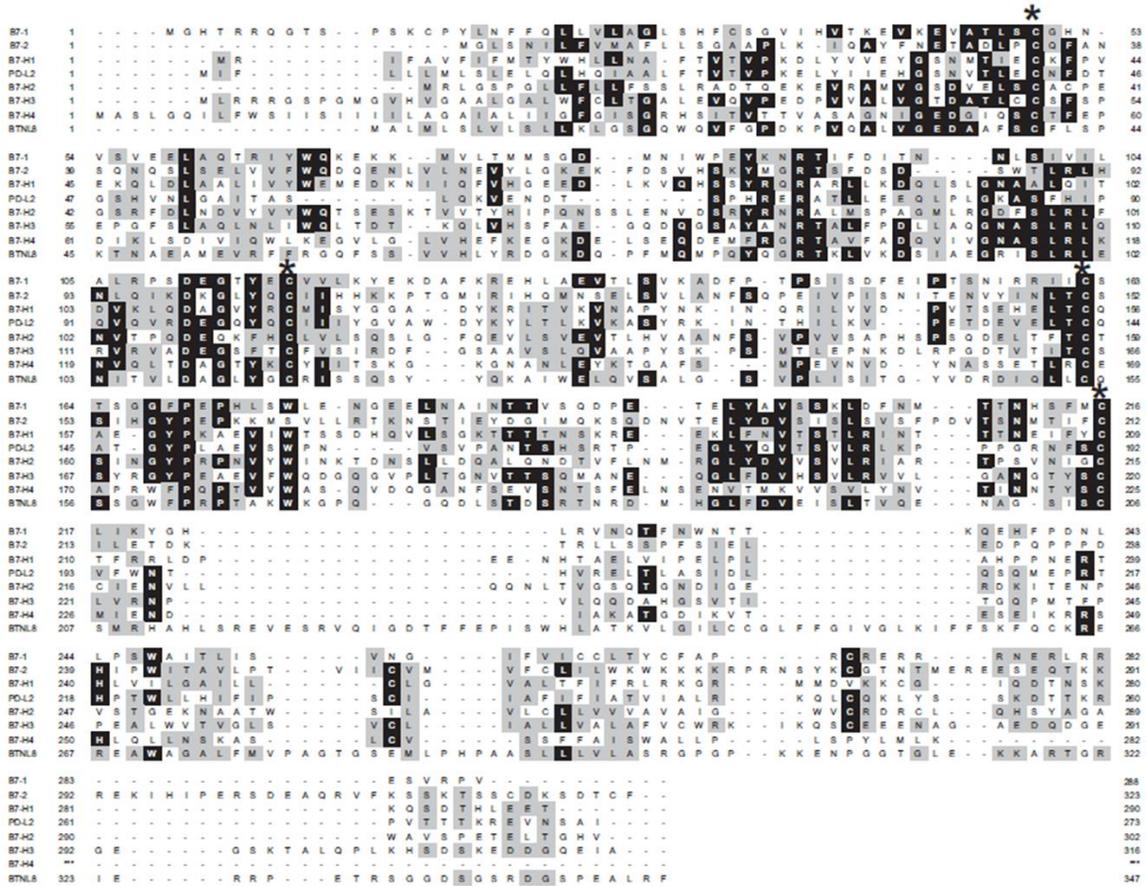


Рисунок 27. Сравнение B7NL8 с другими членами семейства B7. Идентичные аминокислоты обозначены черным цветом. Гомологичные аминокислоты обозначены серым цветом. Консервативные цистеины обозначены звездочками.

На рис. 28 представлено филогенетическое дерево молекул семейства B7 и BTN. Видно, что молекулы, наиболее близкие по аминокислотному составу, такие как B7-1 и B7-2; BTN2A1 и BTN2A2; BTN3A1, BTN3A2 и BTN3A3, формируют отдельные кластеры.

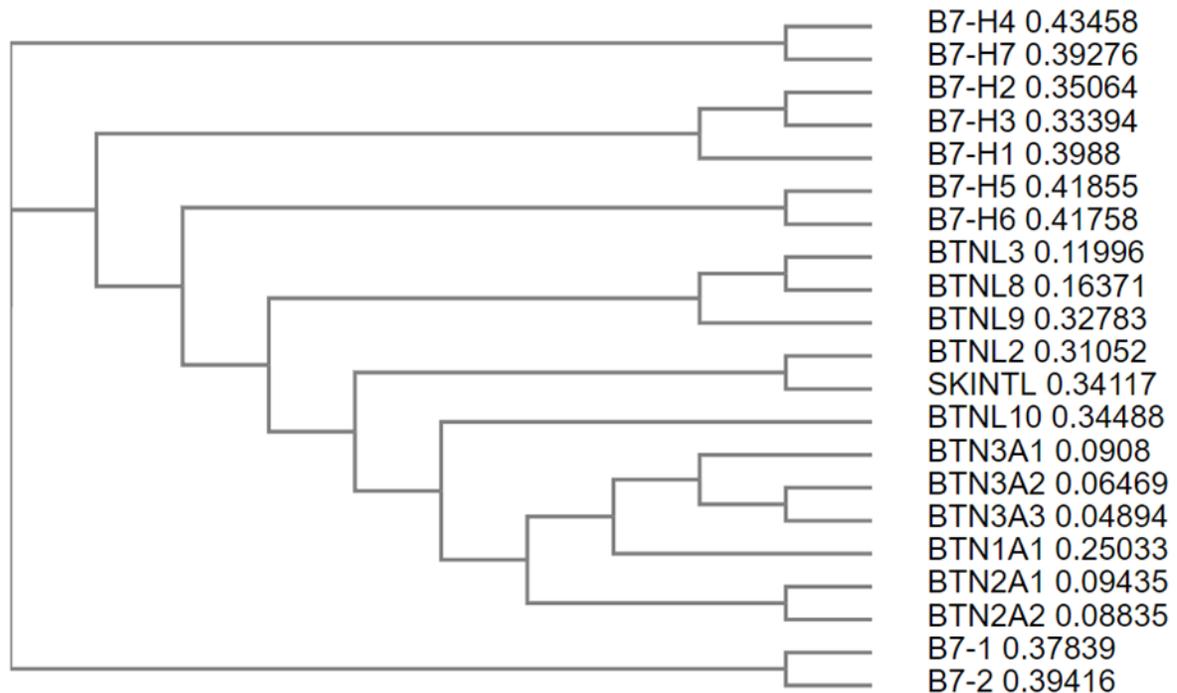


Рисунок 28. Филогенетическое дерево молекул семейства B7 и BTN.

3.17 Экспрессия мРНК, кодирующей изоформы BTNL8

Для того, чтобы определить клеточную и тканевую экспрессию мРНК, кодирующей обе изоформы BTNL8, использовалась ПЦР в реальном времени. Наборы праймеров и проб были разработаны для проведения ПЦР на панели кДНК, полученных из различных клеток и тканей человека (рис. 29). Все образцы кДНК были нормализованы и проверены с помощью праймеров и проб для GAPDH – гена, экспрессирующегося на постоянном уровне во всех клетках. Было обнаружено, что мРНК, кодирующие обе изоформы BTNL8, присутствуют в кишечнике, легких, семеннике, лимфоузлах и щитовидной железе. Интересно, что B7 изоформа, но не BTN синтезируется в селезенке. При анализе первичных клеток было обнаружено, что BTNL8 мРНК присутствует только в покоящихся нейтрофилах, но при активации с ЛПС и TNF-а уровень BTNL8 заметно снижался.

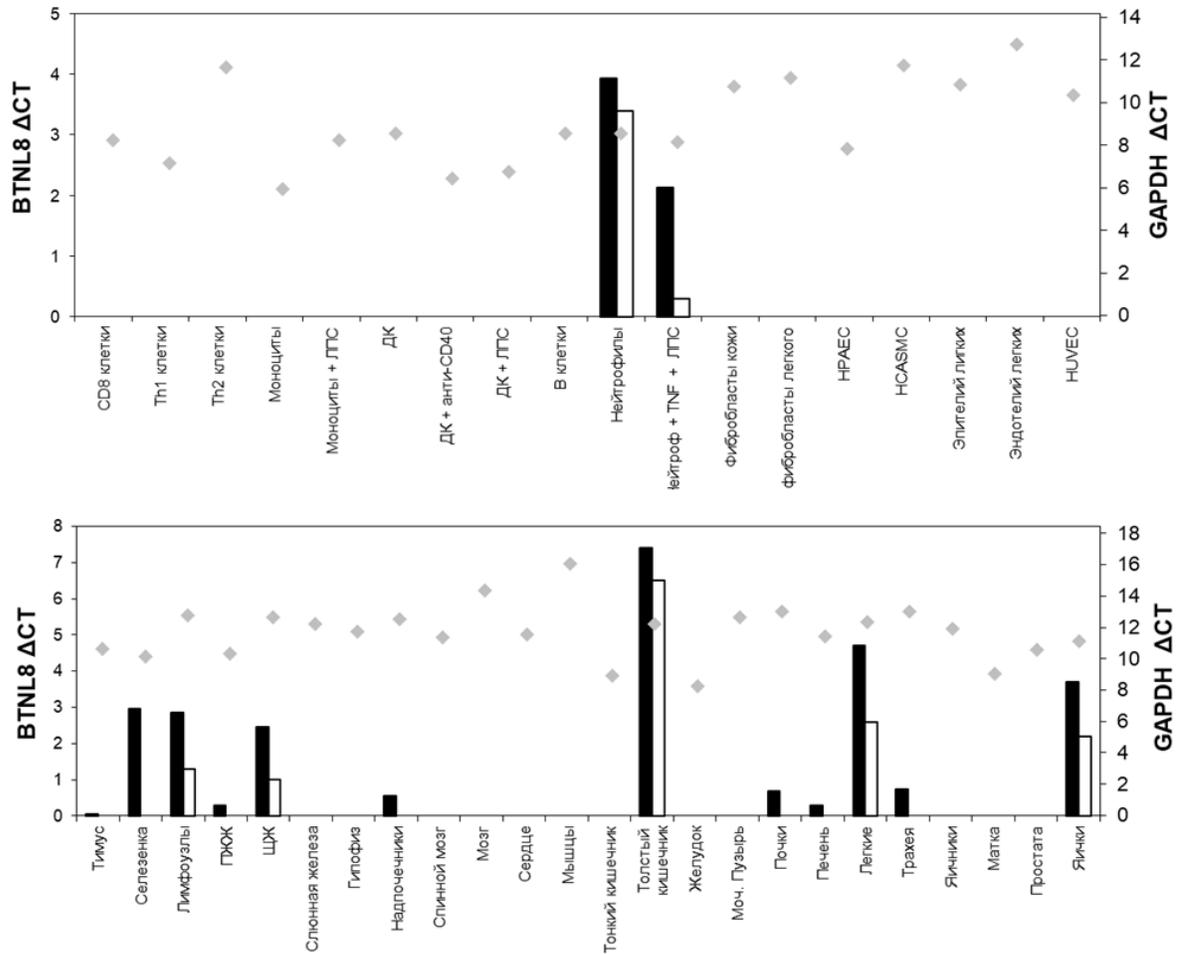


Рисунок 29. Анализ экспрессии BTNL8 с помощью ПЦР в реальном времени. кДНК из тканей и клеток здоровых доноров анализировали с помощью наборов праймеров и проб, специфических для двух изоформ BTNL8 (B7-подобную BTNL8 (черные столбцы), BTN-подобную BTNL8 (белые столбцы)) и GAPDH (серые ромбы). Результаты представлены в виде ΔCT (количество циклов амплификации), где $\Delta CT = 35 - (CT \text{ эксперимента})$.

3.18 Анализ экспрессии рецептора для BTNL8

Рецепторы для всех известных B7 лигандов экспрессируются на поверхности Т-лимфоцитов. Для того, чтобы исследовать экспрессию рецептора, взаимодействующего с BTNL8 лигандом, были выполнены эксперименты с использованием проточной цитометрии, где рекомбинантный химерный белок, созданный из внеклеточной части BTNL8 и Fc-домена

иммуноглобулина, использовался для окраски клеток. Так как обе изоформы имеют идентичную внеклеточную часть, химерный белок позволяет оценить взаимодействие обеих изоформ с предполагаемым рецептором. Было показано, что BTNL8Ig взаимодействует с неактивированными Т-лимфоцитами и Jurkat Т-клеточной линией (рис. 30). Человеческие Т-лимфоциты и Jurkat клетки, активированные с ФГА или ФМА + иономицином, в течение 24 ч теряли экспрессию предполагаемого рецептора, взаимодействующего с BTNL8Ig (рис. 30). Важно отметить, что экспрессия BTNL8 рецептора также обнаруживалось на Jurkat клетках после 72 ч инкубации без активатора. Рецептор BTNL8 не был обнаружен на В-лимфоцитах, НК-клетках и моноцитах (данные не представлены). В7-Н2Ig, химерный рекомбинантный белок лиганда для рецептора ICOS, использовался в качестве положительного контроля в экспериментах с использованием проточной цитометрии. В7-Н2Ig взаимодействовал с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами. Связывание В7-Н2Ig с активированными клетками было значительно сильнее, чем связывание с неактивированными Т-лимфоцитами (рис. 30).

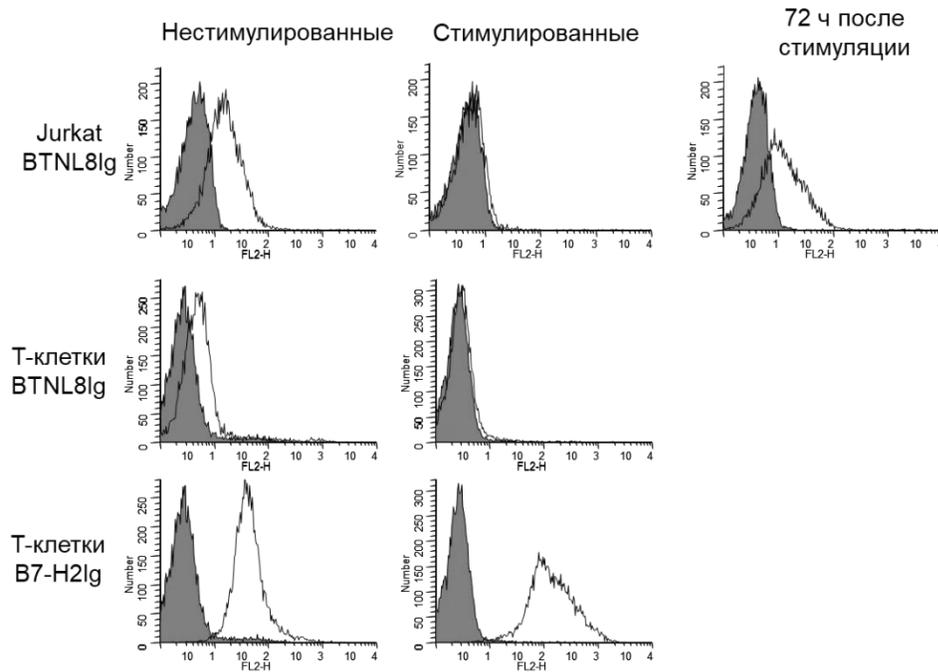


Рисунок 30. Экспрессия предполагаемого рецептора для BTNL8 на Т-клетках. Jurkat клетки стимулировали с ФМА + иономицин в течение 24 ч (верхние гистограммы) и окрашивали с BTNL8Ig. Свежевыделенные человеческие Т-лимфоциты стимулировались с ФГА в течение 24 ч. Клетки красились с BTNL8Ig или B7-H2Ig (белые гистограммы), контрольным Ig (красные гистограммы) с последующим добавлением антител против Fc-части человеческого IgG1, конъюгированных с PE.

3.19 Связывание BTNL8Ig с известными рецепторами семейства B7

С помощью ИФА было также определено, что BTNL8Ig не связывается с известными рецепторами лигандов семейства B7, такими как CD28, CTLA4, ICOS и PD-1 (рис. 31). Изложенные выше результаты говорят о том, что BTNL8 взаимодействует со специфическим, неизвестным рецептором, который экспрессируется на поверхности неактивированных Т-лимфоцитов.

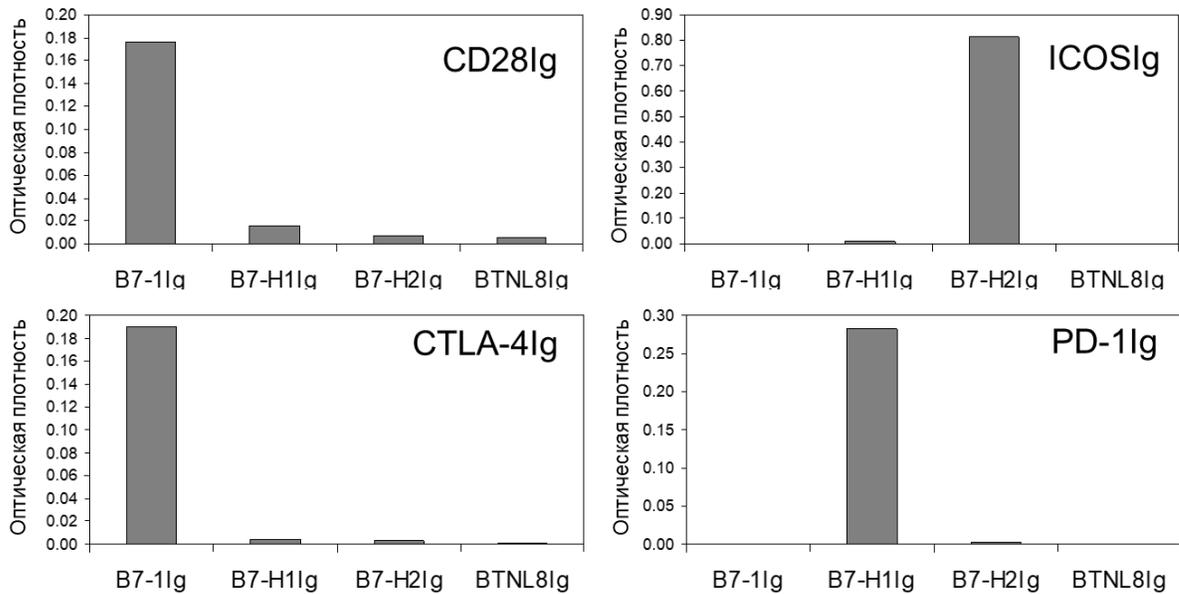


Рисунок 31. B7NL8Ig не взаимодействует с известными рецепторами семейства B7. Планшеты для ИФА были покрыты химерными белками известных рецепторов, соединенными с Fc-частью человеческого IgG1. В лунки добавляли рекомбинантные химерные белки лигандов, содержащие Fc-часть мышиной молекулы IgG2a. Связывание определяли с помощью антител против мышиного IgG2a, конъюгированного с HRP.

3.20 Костимуляция Т-клеточной пролиферации с B7NL8 молекулой

Так как было определено, что B7NL8 связывается с предполагаемым рецептором на Т-клетках, следующим логическим действием было изучение эффектов B7NL8 на функцию Т-лимфоцитов. Для этого CD4 и CD8 Т-лимфоциты инкубировались в 96-луночной планшете с иммобилизованными МАТ против CD3 и B7NL8Ig. Пролиферацию Т-клеток определяли с помощью теста включения BrdU. Было обнаружено, что B7NL8Ig рекомбинантный белок сам по себе (иммобилизованный в концентрации 10 мкг/мл) не вызвал пролиферации Т-лимфоцитов (рис. 32). Однако статистически значимое усиление пролиферации наблюдалось, когда CD4 и CD8 Т-лимфоциты инкубировались в присутствии субоптимальной дозы анти-CD3 МАТ (20 нг/мл)

и BTNL8Ig (10 мкг/мл) по сравнению с пролиферацией Т-клеток, культивированных только с анти-CD3 МАТ или контрольным рекомбинантным Ig (рис. 32). Уровень пролиферации Т-лимфоцитов был одинаково высок в лунках, покрытых BTNL8Ig или контрольными Ig, и оптимальной дозой анти-CD3 МАТ (100 нг/мл). Результаты говорят о том, что BTNL8 усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов, когда они получают субоптимальную стимуляцию через TCR/CD3 комплекс.

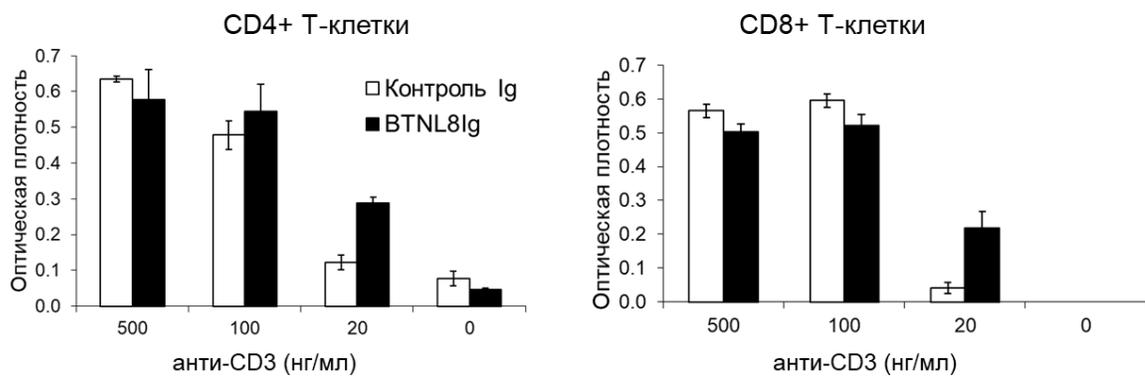


Рисунок 32. BTNL8 костимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Очищенные CD4+ и CD8+ Т-клетки (2×10^5 клеток/лунку) культивировали в 96-луночных планшетах, покрытых указанными дозами анти-CD3 МАТ и 10 мкг/мл контрольных Ig (белые столбцы) или BTNL8Ig (черные столбцы). Через 24 часа в лунки добавляли BrdU и культивировали дополнительные 24 часа. Включение BrdU во вновь синтезированную ДНК определяли с помощью специфических МАТ. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение оптической плотности (OD, optical density) для трех лунок. Один из четырех независимых экспериментов представлен.

3.21 BTNL8 увеличивает продукцию цитокинов *in vitro*

Эффект BTNL8 на продукцию некоторых цитокинов был также исследован. Т-клетки культивировали в планшетах с иммобилизованными анти-CD3 и BTNL8Ig. Т-лимфоциты, культивируемые в присутствии BTNL8Ig,

продуцировали статистически более высокие уровни IFN- γ , TNF- α , IL-8 и IL-10 в сравнении с Т-клетками, инкубированными в присутствии контрольных Ig (рис. 33). В качестве положительного контроля был использован В7-1Ig химерный белок. Было обнаружено, что Т-клетки, культивированные с анти-CD3, продуцировали более высокие уровни цитокинов, которые составили 12580 ± 2780 пг/мл для IFN- γ , 2121 ± 316 пг/мл для IL-8, 1540 ± 506 пг/мл для TNF- α и 1422 ± 437 пг/мл для IL-10. Для того чтобы подтвердить достоверность результатов экспериментов, проведенных с применением рекомбинантного химерного BTNL8Ig, были использованы 293 клетки, трансфицированные плазмидой, кодирующей BTNL8. Экспрессия BTNL8 на поверхности трансфицированных клеток была подтверждена с помощью антител, специфических для BTNL8 и проточной цитометрии (данные не представлены). Т-лимфоциты, культивированные с клетками 293, трансфицированными BTNL8, продуцировали в 3,5 раза больше IFN- γ по сравнению с лимфоцитами, инкубированными с контрольными клетками 293 (рис. 33). IL-10 был обнаружен только в супернатантах Т-клеток, культивированных в присутствии BTNL8 трансфицированных клеток (рис. 33). Таким образом, было показано, что BTNL8 значительно усиливает продукцию ряда цитокинов в ответ на стимуляцию анти-CD3 и аллоантигенами.

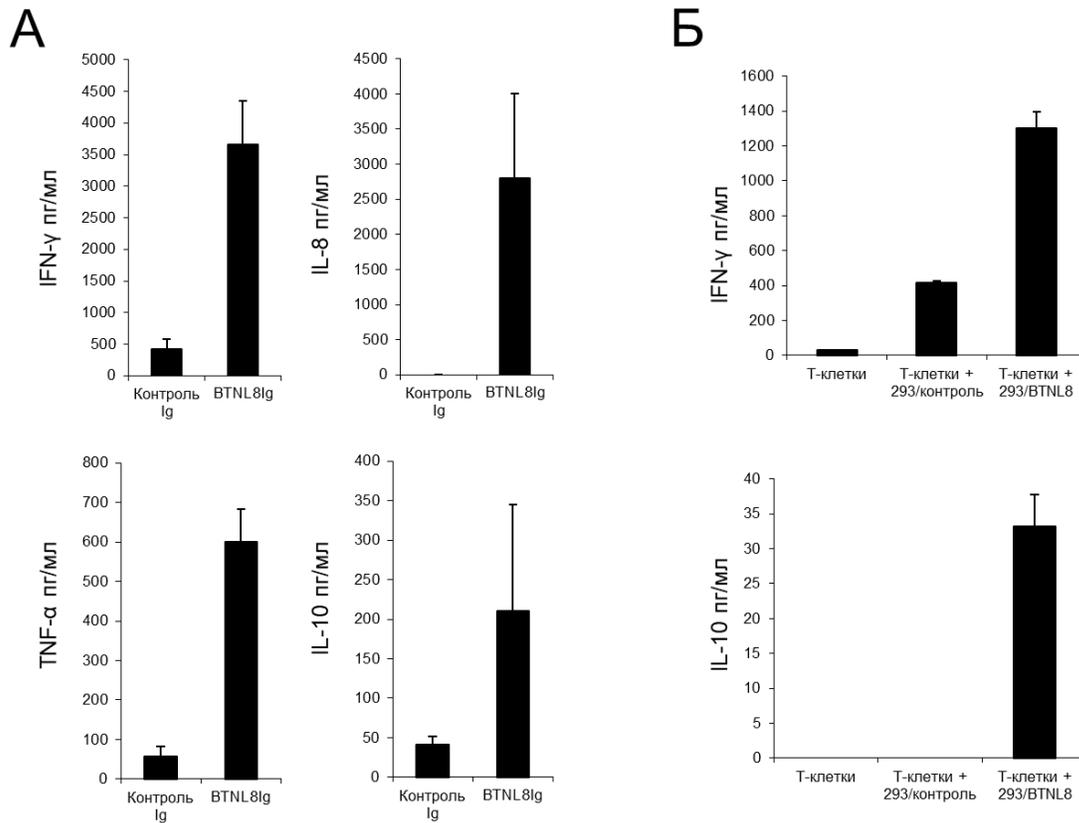


Рисунок 33. BTNL8 костимулирует продукцию цитокинов Т-лимфоцитами. (А) Т-клетки, очищенные из периферической крови, культивировали в 96-луночных планшетах, покрытых анти-CD3 МАТ и контрольными Ig или BTNL8Ig. Супернатанты собирались через 24 часа. (Б) Т-лимфоциты культивировали с облученными 293 клетками, трансфицированными контрольной плазмидой или плазмидой, кодирующей BTNL8. Супернатанты собирались через 120 часов. Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли с помощью ИФА. Один из трех независимых экспериментов представлен. * – $p < 0,05$.

3.22 BTNL8 усиливает первичный гуморальный ответ *in vivo*

Для того чтобы проверить эффект BTNL8 на иммунный ответ *in vivo*, мышам вводили ежедневно в течение 6 дней внутрибрюшинно BTNL8Ig, мыши также получали внутрибрюшинную инъекцию OVA с окисью алюминия или без на 2 и 23 день эксперимента. Для оценки первичного и вторичного

иммунного ответа образцы крови собирались на 16 и 30 день соответственно. Уровень сывороточных IgG1, IgG2a и IgG2b против OVA определяли с помощью ИФА. Было обнаружено, что мыши, получавшие инъекцию BTNL8Ig и иммунизированные с OVA/алюм, продуцировали в среднем 2,1 мг/мл специфических IgG1 во время первичного ответа против OVA, в то время как мыши, получавшие инъекцию контрольного Ig и OVA/алюм, продуцировали только 4 мкг/мл OVA специфических IgG1 (рис. 34). Уровень антиген-специфических IgG2a не определялся в сыворотке у мышей после введения OVA/алюм и контрольного Ig. Однако 5 из 6 мышей, которые получали инъекцию BTNL8Ig и OVA/алюм, показали увеличенный уровень продукции антиген-специфических IgG2a (среднее значение = 39,4 нг/мл) при первичном ответе (рис. 34). Значительных изменений в уровне продукции OVA специфических IgG1, IgG2a и IgG2b не наблюдалось в группах мышей, получавших инъекцию OVA без адъюванта, независимо от того, получали ли они инъекции BTNL8Ig или нет.

Как и ожидалось, уровни OVA специфических IgG1 и IgG2a были значительно выше у мышей, получавших две инъекции OVA (вторичный иммунный ответ). Однако в отличие от первичного гуморального ответа BTNL8Ig не усиливал вторичный ответ на антиген. Не было обнаружено статистически значимых отличий в продукции IgG1 и IgG2a у мышей, получавших либо BTNL8Ig, либо контрольный Ig (рис. 34). Эти результаты свидетельствуют о том, что BTNL8 костимулирует первичный иммунный ответ, но не имеет эффекта на вторичный антиген-специфический гуморальный иммунитет.

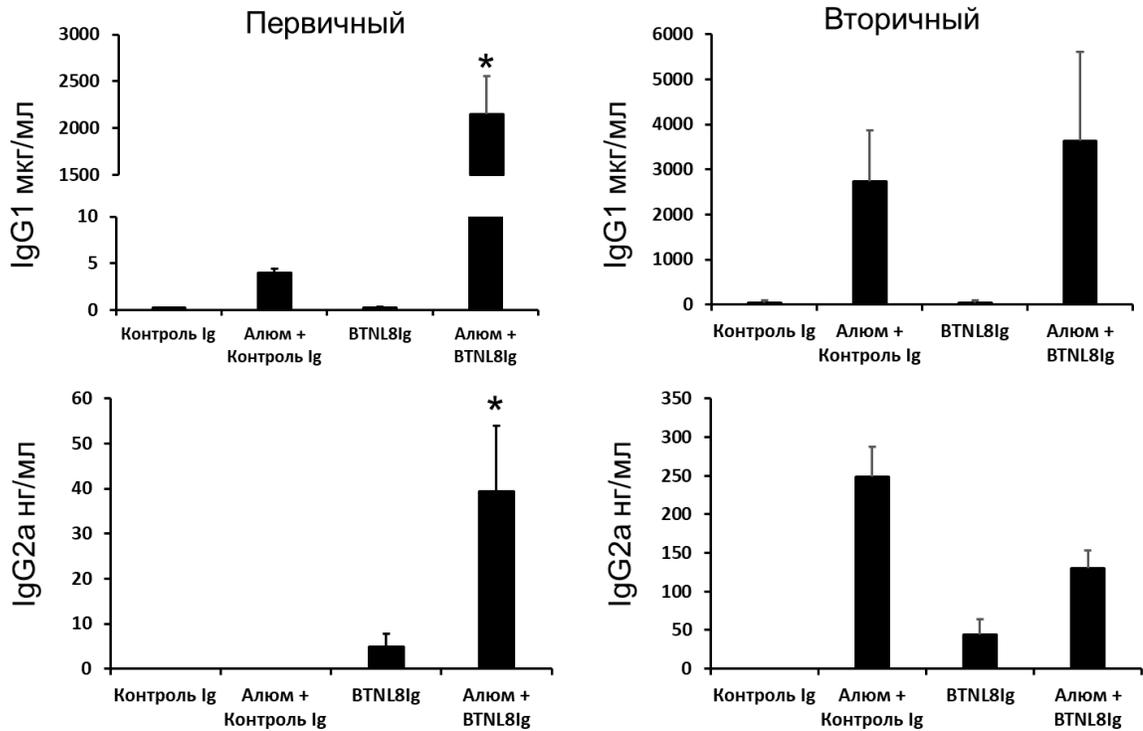


Рисунок 34. BTNL8 костимулирует первичный гуморальный иммунный ответ. Мышей иммунизировали с OVA±Alum. Сыворотки собирались на 14 день после первой инъекции OVA (левые диаграммы) или на 7 день после второй инъекции OVA (правые диаграммы). Уровень OVA специфических IgG разных изотипов определяли с помощью ИФА. * – $p > 0,05$.

3.23 Костимуляция натурального иммунного ответа

Обычно термин «костимуляция» используется для объяснения усиления функциональной активности Т-лимфоцитов, когда в качестве первого сигнала выступает взаимодействие TCR и МНС с антигеном, в то время как взаимодействие между костимуляторными лигандами и их рецепторами обеспечивает оптимальную стимуляцию Т-клеточного иммунного ответа. Наши предварительные наблюдения говорят о том, что оптимальная активация НК-клеток также зависит от взаимодействия с другими клетками, что, возможно, опосредованно костимуляторными молекулами. Предварительные

результаты свидетельствуют, что для активации NK-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоциты играют важную роль.

Как показано на рисунке 35А, NK-клетки, культивированные с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами, не экспрессируют CD69 молекулу, маркер активации NK-клеток. Однако инкубация NK-клеток с иммобилизованными hIgG1 вызывала экспрессию CD69 у 25 % клеток. Добавление *in vitro* активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов увеличивало экспрессию CD69 на NK-клетках до 45,9 % (рис. 35Б). Также наблюдался сходный профиль экспрессии CD54, еще одной молекулы, которая экспрессируется только на активированных NK-клетках (рис. 35Б). Иммобилизованный hIgG1 сам по себе или в сочетании с NK-клетками не вызывал экспрессии маркеров активации на $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах. Так как культивирование без hIgG1 не приводило к активации NK-клеток, в дальнейших экспериментах иммобилизованный hIgG1 всегда использовали в качестве первичного стимулятора NK-клеток.

Культивирование NK и $\gamma\delta$ Т-клеток в соотношении 2:1 и 4:1 (2×10^5 NK-клеток с 10^5 или 5×10^4 $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами соответственно) приводило к значительному увеличению экспрессии CD69 и CD54, в то время как культивирование NK-клеток с меньшим количеством $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (соотношение 20:1) не приводило к увеличению экспрессии маркеров активации. В дальнейших экспериментах использовалось соотношение NK/ $\gamma\delta$ Т-клеток 4:1 как наиболее оптимальное для изучения эффектов костимуляции.

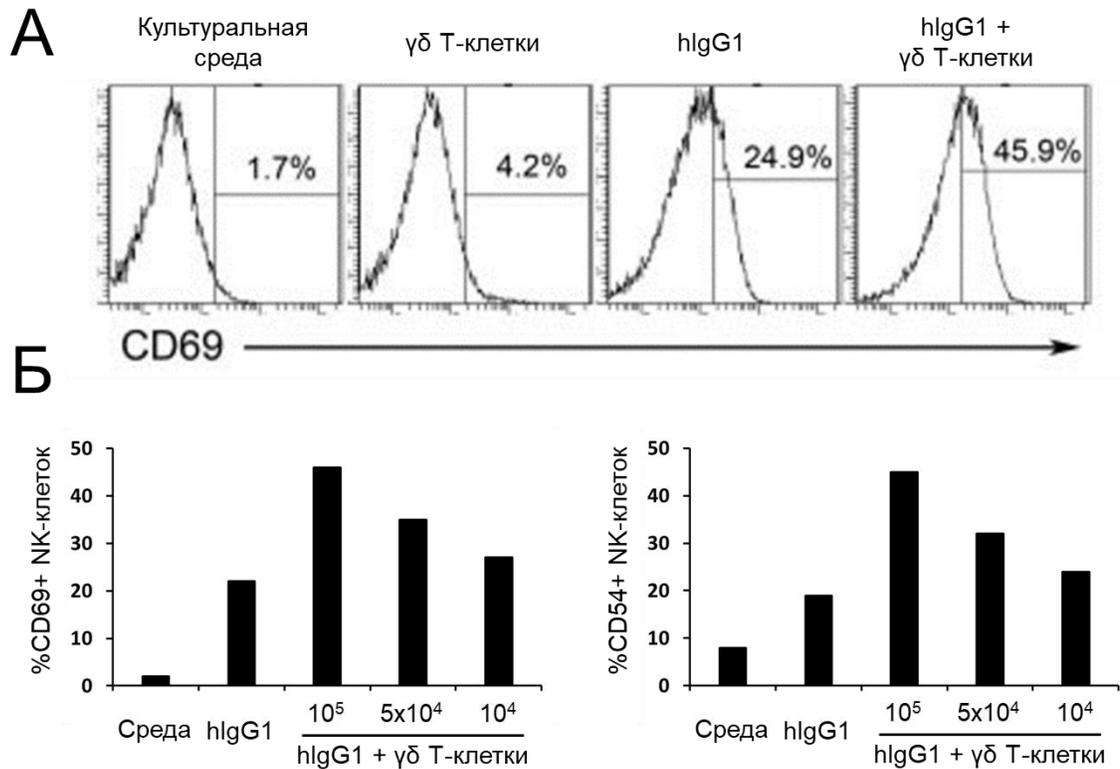


Рисунок 35. Прайминг NK-клеток с иммобилизованным hIgG1 и костимуляция в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. (А) Очищенные NK-клетки (2×10^5 клетки/лунку) культивировали с иммобилизованными hIgG1 и/или с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами (указанные концентрации), активированными *in vitro* с IPP и IL-2. Уровень экспрессии CD69 и CD54 на гейтированных CD3-CD56+ NK-клетках определяли с помощью проточной цитометрии.

3.24 Эффект культивирования NK-клеток с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами на противоопухолевую цитотоксичность

Для того, чтобы определить, влияют ли $\gamma\delta$ Т-лимфоциты на цитотоксическую активность NK-клеток, очищенные NK-клетки культивировались в присутствии иммобилизованных IgG1 с или без *in vitro* IPP активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. В качестве контроля NK-клетки культивировались со средой в лунках без иммобилизованного IgG1. После 48 ч культивирования NK-клетки были заново очищены с помощью магнитных микрочастиц, чистота полученной популяции была 96-99 % (рис. 36А).

Исследования цитотоксической активности этих клеток против различных опухолевых линий показали, что НК-клетки, культивированные только в среде или с иммобилизованными hIgG1, не лизировали клетки плоскоклеточной карциномы (TU167, 012SCC, MDA1986), меланомы (Mel526), рака молочной железы (MDA MB231 и MCF-7), В-клеточной лимфомы (Daudi), или Т-клеточной лимфомы (Jurkat). Однако культивирование НК-клеток с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами индуцировало цитотоксическую активность против опухолевых клеточных линий, перечисленных выше (рис. 36Б). Активация НК-клеток не зависела от HLA фенотипа, так как аутологичные и аллогенные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты усиливали цитотоксическую активность. HLA независимая НК-активация была показана в более чем 20 независимых экспериментах. Основываясь на этих результатах, в последующих экспериментах мы использовали НК-клетки и $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, выделенные из PBMCs различных доноров, что дало возможность получить достаточное количество клеток для функционального и фенотипического анализа. В целом, представленные результаты говорят о том, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, активированные в присутствии IPP+IL-2 *in vitro*, усиливают прямую цитотоксическую активность НК-клеток против различных опухолевых линий.

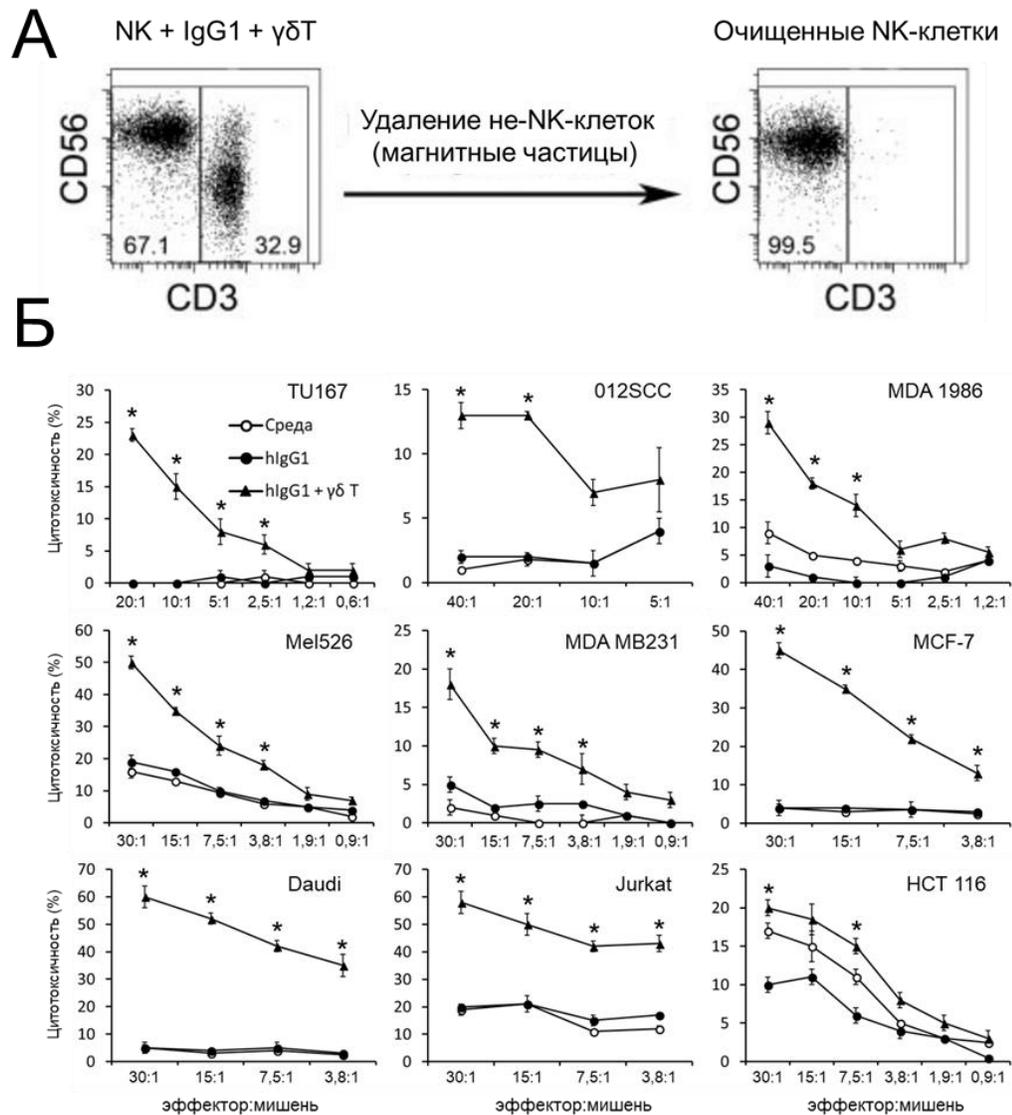


Рисунок 36. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты индуцируют NK-опосредованную цитотоксичность против различных опухолей. (А) Очищенные NK-клетки культивировали с ИРР активированными $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами в присутствии иммобилизованного IgG1 в течение 48 ч. (Б) После культивирования NK-клетки были снова очищены, исследованы с помощью проточной цитометрии, и цитотоксическая активность этих клеток анализировалась с помощью стандартного теста высвобождения радиоактивного ^{51}Cr . Результаты представлены как среднее значение цитотоксичности \pm SD. * – $P > 0,05$ по сравнению с NK-клетками, культивированными без $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

3.25 Роль межклеточных взаимодействий в активации NK-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами

Для того, чтобы изучить механизмы активации NK-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами, были использованы так называемые transwell системы, в которых клеточные популяции разделены проницаемой мембраной, что позволяет определить растворимые факторы или клеточные взаимодействия, которые требуются для их активации. NK-клетки помещались в нижние лунки планшета с иммобилизованными hIgG1, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты добавлялись в верхние или нижние лунки. Как и ожидалось, NK-клетки, культивируемые вместе с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами в нижних лунках, показали увеличенный уровень экспрессии маркеров активации CD69 и CD54 молекул (рис. 37). Однако когда NK-клетки были отделены от $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов мембраной с размером пор 0,4 мкм, увеличения экспрессии маркеров активации не наблюдалось. Эти результаты свидетельствуют о том, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты активируют NK-клетки путем межклеточных взаимодействий.

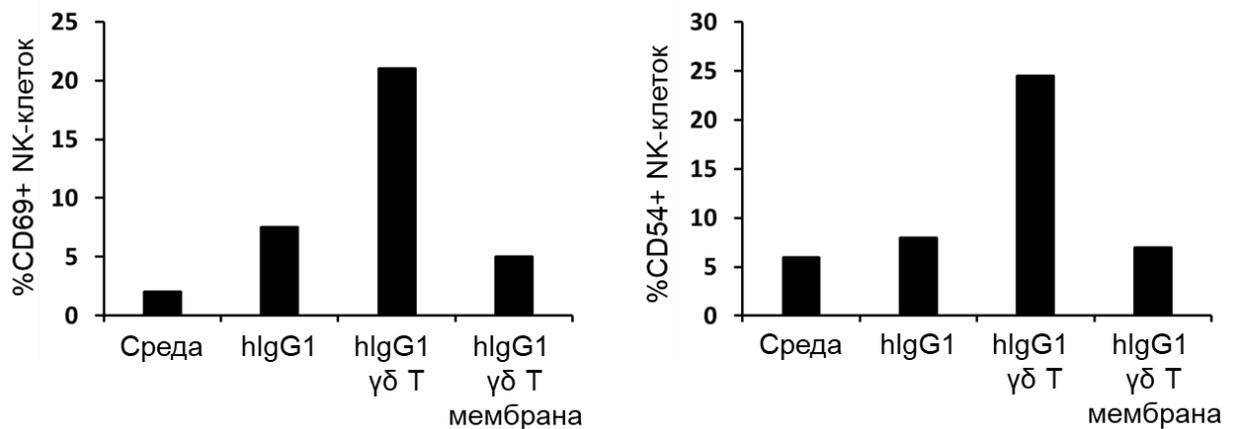


Рисунок 37. Межклеточные взаимодействия необходимы для активации NK-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами. NK-клетки культивировались вместе или разделенные проницаемой мембраной (transwell). После 48 ч инкубации экспрессия CD69 и CD54 на NK-клетках анализировалась с помощью проточной цитометрии.

3.26 Экспрессия костимуляторных молекул на активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах и НК-клетках

Известно, что лиганды В7 и TNF семейств необходимы для оптимальной стимуляции клеток иммунной системы (Croft, 2014; Chen and Flies, 2013). Так как в вышеописанных экспериментах было показано, что для активации требуется взаимодействие между НК-клетками и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами, экспрессия костимуляторных лигандов и рецепторов на поверхности этих клеточных популяций была исследована. В первую очередь была изучена экспрессия костимуляторных лигандов на $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах. Как показано на рис. 38А, нестимулированные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты не экспрессировали CD80, CD86, CD252 (OX40L) или CD137L (4-1BBL). Однако после стимуляции с IPP *in vitro* $\gamma\delta$ Т-лимфоциты экспрессировали CD86 (86 %), CD252 (12 %) и CD137L (58 %). НК-клетки экспрессировали CD134 (OX40) и CD137 (4-1BB) после прайминга IgG1, и экспрессия этих молекул была увеличена в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (рис. 38А). Не обнаружено экспрессии CD28, CD152 (CTLA-4), CD278 (inducible co-stimulator [ICOS]) и CD279 (PD-1) на поверхности НК-клеток даже после инкубации с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами (рис. 38Б).

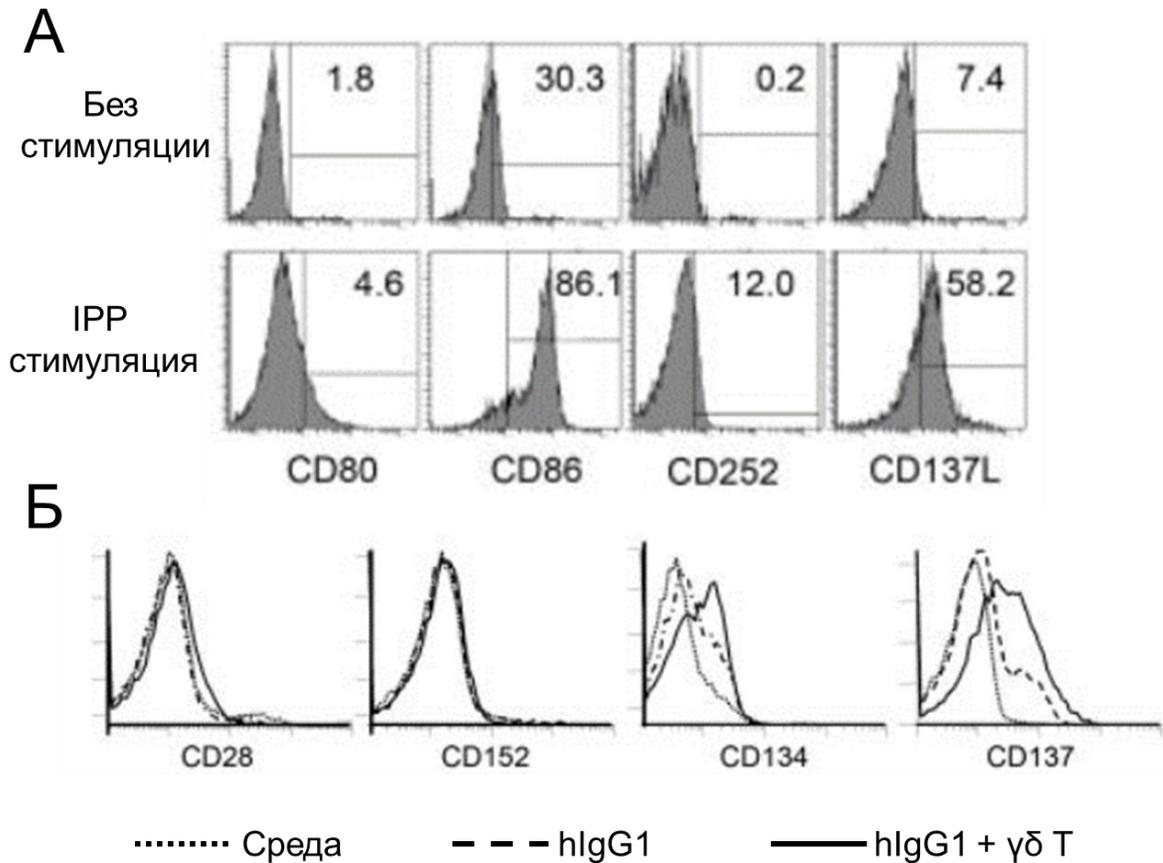


Рисунок 38. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты экспрессируют костимуляторные лиганды, а НК-клетки экспрессируют рецепторы. (А) Свежевыделенные или активированные $\gamma\delta$ Т-лимфоциты были окрашены с МАТ против CD80, CD86, CD252 (OX40L) и CD137L (41BBL). Экспрессия лигандов на гейтированных CD3+gdTCR+ клетках показана. (Б) НК-клетки, культивированные с различными стимуляторами или без, были окрашены с МАТ против CD28, CD152 (CTLA-4), CD134 (OX40) и CD137 (4-1BB). Гистограммы гейтированных CD3-CD56+ НК-клеток показаны.

3.27 Роль CD137 и CD137L взаимодействия в активации НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами

Тот факт, что при стимуляции НК-клеток увеличивается экспрессия CD137 и CD134, костимуляторных рецепторов, дает основание предположить, что эти молекулы могут участвовать в усилении противоопухолевого

иммунного ответа, опосредованного НК-клетками. Для проверки этой гипотезы были использованы рекомбинантные химерные белки CD134Ig и CD137Ig, которые блокируют связывание соответствующих костимуляторных молекул. Добавление в культуру клеток CD152Ig (использованного в качестве отрицательного контроля) не ингибировало активацию НК-клеток в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (результаты не представлены). Однако CD137Ig частично ингибировал экспрессию CD54 на поверхности НК-клеток (рис. 39А). Эти результаты говорят о том, что CD137 участвует в активации НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами.

Для подтверждения участия CD137 в костимуляции НК-клетки инкубировались с клетками P815, трансфицированными CD137L (рис. 39Б). P815 клетки, экспрессирующие CD137L, индуцировали значительный уровень экспрессии маркеров активации CD54 или CD25 (рис. 39Б), в то время как контрольные P815 клетки не вызывали активации НК-клеток. Добавление CD137Ig химерного белка в лунки, содержащие НК-клетки и CD137L-трансфицированные P815 клетки, полностью ингибировало экспрессию CD54 или CD25 на НК-клетках (рис. 39Б), указывая на то, что CD137Ig блокирует CD137/CD137L взаимодействие. Эти данные свидетельствуют, что CD137/CD137L взаимодействие, по крайней мере частично, вовлечено в активацию НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами.

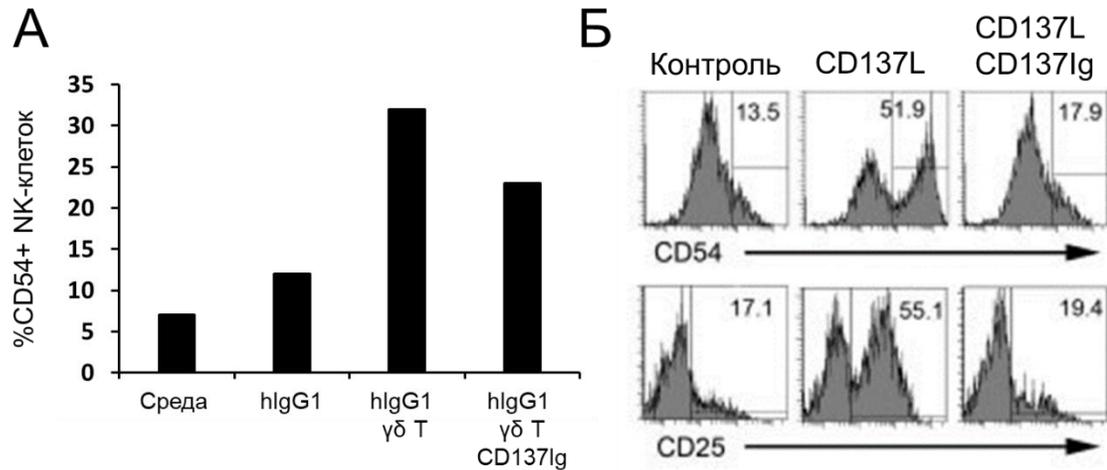


Рисунок 39. Блокирование CD137L снижает активацию NK-клеток в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. (А) NK-клетки культивировались с активированными $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами в присутствии CD137Ig химерного рекомбинантного белка или без. (Б) NK-клетки культивировались с P815 клетками, трансфицированными CD137L или контрольными P815, в присутствии CD137Ig химерного рекомбинантного белка или без. После 48 часов культивирования экспрессию CD54 и CD25 на CD3-CD56+ NK-клетках анализировали с помощью проточной цитометрии.

3.28 Эффект CD137/CD137L взаимодействия на цитотоксическую активность NK-клеток

Следующие эксперименты были нацелены на изучение роли CD137 в активации цитотоксической активности NK-клеток. Результаты, представленные на рис. 40, показывают, что NK-клетки после прайминга с иммобилизованными hIgG1 не проявляют цитолитической активности, в то время как добавление $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов значительно усиливало NK-опосредованный лизис опухолевых клеток (рис. 40). Добавление CD137Ig в культуру NK и $\gamma\delta$ Т-клеток снижало цитотоксическую активность NK-клеток на 40 %; это говорит о том, что CD137 вовлечен в регуляцию противоопухолевой функции NK-клеток. CD152Ig химерный белок, содержащий аналогичный Fc-регион IgG1, не приводил к ингибированию лизинга опухолей NK-клетками (результаты не представлены). Для того, чтобы подтвердить роль CD137

сигнала в активации НК-опосредованной цитотоксичности, НК-клетки культивировали с P815 клетками, экспрессирующими CD137L. Результаты, представленные на рис. 40Б, показывают, что НК-клетки, культивированные в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, показывают 29 % цитотоксичности против TU167 клеток при соотношении эффектор:мишень 20:1. При том же соотношении эффектор:мишень НК-клетки, культивированные в присутствии CD137L трансфицированных P815 клеток показали цитотоксичность 13 %, в то время как добавление CD137Ig снижало цитотоксичность до 6 % – уровня контроля. Эти результаты свидетельствуют, что CD137 по крайней мере частично вовлечен в $\gamma\delta$ Т-опосредованную регуляцию цитотоксической активности НК-клеток.

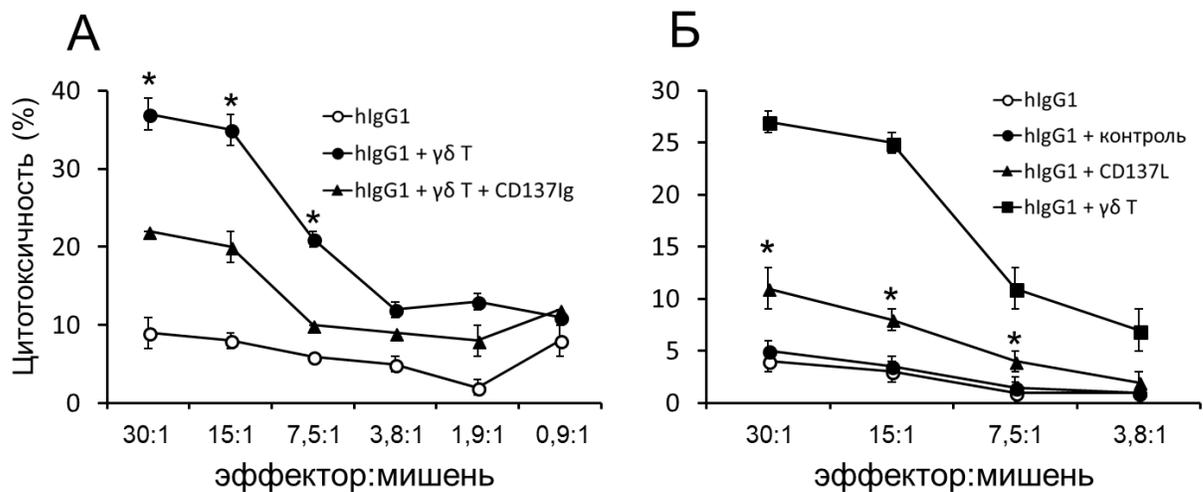


Рисунок 40. CD137 регулирует цитотоксическую активность НК-клеток. (С) Рекombинантный химерный протеин CD137Ig добавляли в культуру НК и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. (D) НК-клетки культивировали с контрольными P815 клетками или P815 клетками, экспрессирующими CD137L. В некоторые культуры добавляли CD137Ig. После 48 ч инкубации НК-клетки очищали и анализировали цитотоксичность. * – $P > 0,05$ по сравнению с hlgG1 контроль.

3.29 Роль NKG2D в NK-опосредованной цитотоксичности

Далее были исследованы механизмы, которые вовлечены в лизис опухолевых клеток NK-клетками после стимуляции в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Хорошо известно, что NKG2D вовлечен в NK-опосредованную цитотоксичность против многих опухолей. Обычно NK-клетки экспрессируют значительное количество NKG2D молекул на их поверхности. Однако воспроизводимое увеличение NKG2D наблюдалось на NK, полученных от 11 различных доноров, культивированных с иммобилизованными hIgG1 и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами (рис. 41А). Более того, цитолитическая активность NK-клеток, активированных в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, корректировалась с уровнем экспрессии NKG2D (результаты не представлены). Однако увеличения экспрессии других хорошо изученных NK-рецепторов (например, CD16, NKp30, NKp44, NKp46, CD94 CD161) не было обнаружено на поверхности активированных NK-клеток (результаты не представлены).

Было также обнаружено, что многие опухоли экспрессируют ULBP-2 и ULBP-3, рецепторы для NKG2D лиганда, что также говорит в поддержку роли NKG2D в лизисе различных опухолей активированными NK-клетками. Результаты, представленные на рис. 41Б, показывают, что добавление МАТ против NKG2D снижало цитотоксическую активность с 27 % до 17 % при соотношении эффектор:мишень 20:1. Эти наблюдения свидетельствуют, что NK-клетки, культивированные в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, убивают опухолевые клетки через распознавание NKG2D лигандов.

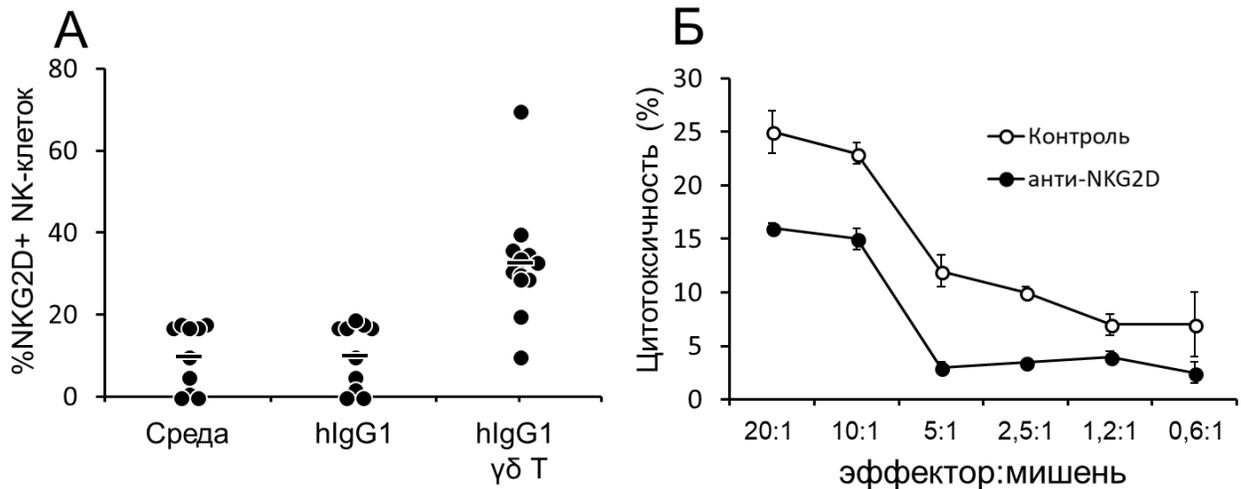


Рисунок 41. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты способствуют увеличению NKG2D экспрессии на НК-клетках, что обеспечивает усиленную цитотоксичность. (А) НК-клетки, полученные от 11 разных доноров, культивировались с активированными $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами в присутствии иммобилизованных IgG1. После 48 ч инкубации экспрессию NKG2D анализировали с помощью проточной цитометрии. Точками обозначен процент экспрессии NKG2D на гейтированных НК-клетках, полученных от разных доноров. Горизонтальными линиями обозначены средние значения для каждой группы. (Б) Цитотоксическая активность НК-клеток после инкубации с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами против TU167 мишеней анализировалась в присутствии блокирующих МАТ, специфичных для NKG2D.

3.30 Регуляция NKG2D экспрессии через CD137

Для проверки гипотезы о том, что CD137 играет роль в регуляции экспрессии NKG2D, на поверхности НК-клеток был использован CD137Ig, который способен блокировать взаимодействие CD137/CD137L. Добавление CD137Ig в культуру НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов снижало экспрессию NKG2D на НК-клетках с 82,8 % до 30,5 % (рис. 42А), что говорит о важной роли CD137 в регуляции NKG2D экспрессии. Эксперименты с использованием P815 клеток, трансфицированных CD137L, также подтвердили, что CD137 сигнал важен для NKG2D экспрессии (рис. 42Б). В целом представленные выше

экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что CD137 играет важную роль в контроле экспрессии NKG2D рецептора, который важен для NK-опосредованного лизиса опухолевых клеток.

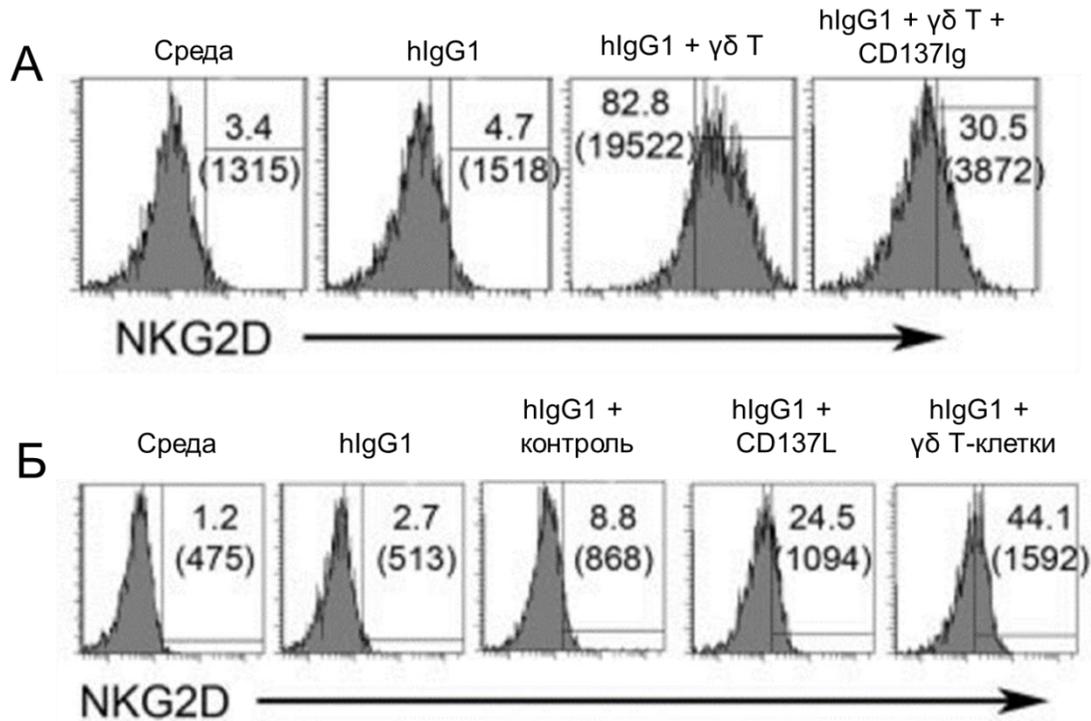


Рисунок 42. Взаимодействие CD137 с CD137L регулирует экспрессию NKG2D на NK-клетках. (А) CD137Ig добавляли в культуры NK и $\gamma\delta$ T-клеток. (Б) NK-клетки культивировались с P815 клетками трансфицированными плазмидой, кодирующей CD137L. В некоторые культуры добавляли CD137Ig. После 48 ч инкубирования анализировали экспрессию NKG2D на NK-клетках. Цифры обозначают процент клеток, экспрессирующих NKG2D. Цифры в скобках обозначают среднюю интенсивность флуоресценции.

3.31 Эффект препаратов, применяемых в клиниках на активацию NK-клеток

Наши результаты говорят о том, что прайминг NK-клеток иммобилизованными hIgG1 вызывает экспрессию CD137 молекулы, которая играет важную роль в активации NK-клеток $\gamma\delta$ T-лимфоцитами. Для того,

чтобы отработать экспериментальную систему для клинической трансляции полученных результатов, сначала было проверено, обеспечивают ли *ex vivo* иммобилизованные hIgG1 прайминг НК-клеток. Результаты, представленные на рис. 43А, показывают, что опухолевая линия TU167, экспрессирующая EGFR и опсонизированная МАТ против EGFR (Цетуксимаб), вызывает увеличение CD137 экспрессии на НК-клетках. Это говорит о том, что МАТ, специфичные к опухолеассоциированным антигенам, способны инициировать первичный сигнал (прайминг), необходимый для активации НК-клеток.

Для того, чтобы изучить возможность применения клинических препаратов для активации НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, в следующих экспериментах были использованы Ритуксимаб, МАТ, распознающие CD20 и используемые для терапии В-клеточной лимфомы, и Зомета (zoledronic acid), бисфосфонат, используемый в клиниках для лечения онкологических больных и индуцирующий активацию $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Культивирование мононуклеарных клеток периферической крови с Ритуксимабом и Зометой приводило к заметному увеличению экспрессии CD69 на НК-клетках. Интересно, что культивирование PBMCs только с Зометой также вызывало активацию НК-клеток (рис. 43Б).

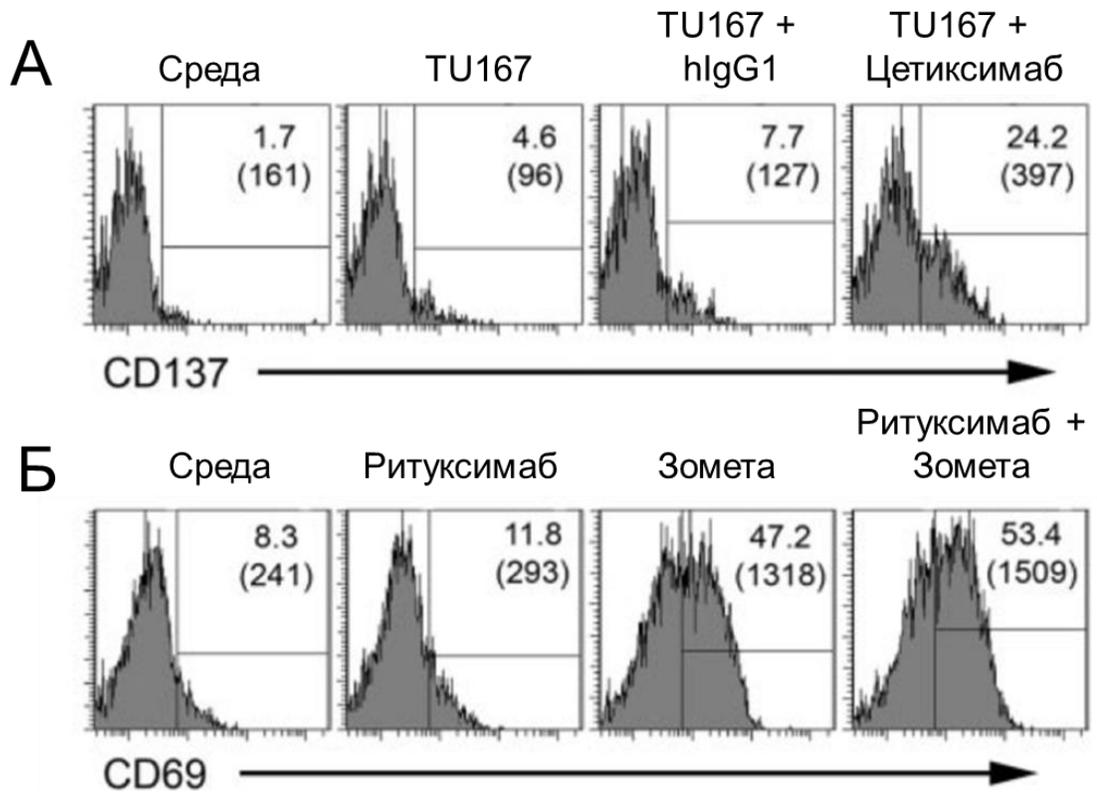


Рисунок 43. Препараты, применяемые в клиниках, способны активировать NK-клетки *ex vivo*. (А) NK-клетки культивировали с TU167 опухолевыми клетками в присутствии контрольных hIgG1 или Цетуксимаба. (Б) МКПК инкубировали в присутствии Ритуксимаба или Зометы или их комбинации. Экспрессию CD137 (А) и CD69 (Б) на CD56+ NK-клетках анализировали с помощью проточной цитометрии.

3.32 Эффекты Зометы и МАТ на цитотоксическую активность NK-клеток

Для того, чтобы определить эффекты $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на активацию NK-клеточной цитотоксичности в физиологических условиях *ex vivo*, МКПК культивировались с Зометой. NK-клетки очищались после культивирования и использовались для анализа прямой и антителозависимой цитотоксичности в стандартном 4-часовом тесте высвобождения радиоактивного хрома. Как показано на рис. 44, инкубация PBMCs с Зометой значительно усиливала прямую цитолитическую активность NK-клеток против SCCN (TU167) и В-клеточной лимфомы (Ramos) мишеней. Важно отметить, что удаление $\gamma\delta$ Т-

лимфоцитов перед началом культивирования значительно снижало прямую цитотоксическую активность НК-клеток.

Как и ожидалось, более высокий уровень НК-опосредованной цитотоксичности против TU167 и Ramos наблюдался в присутствии специфических антител (Цетуксимаб и Ритуксимаб соответственно). Однако культивирование МКПК с Зометой значительно увеличивало ADCC. Более того, удаление $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов перед началом культивирования с Зометой снижало уровень НК-цитотоксичности до уровня, который наблюдался, когда МКПК культивировались без Зометы (рис. 44). Это наблюдение говорит о том, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты необходимы для активации цитотоксичности НК-клеток в присутствии Зометы. В целом, эти результаты доказывают физиологическую и клиническую значимость $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, экспрессии CD137 в активации прямой и антителозависимой НК-цитотоксичности.

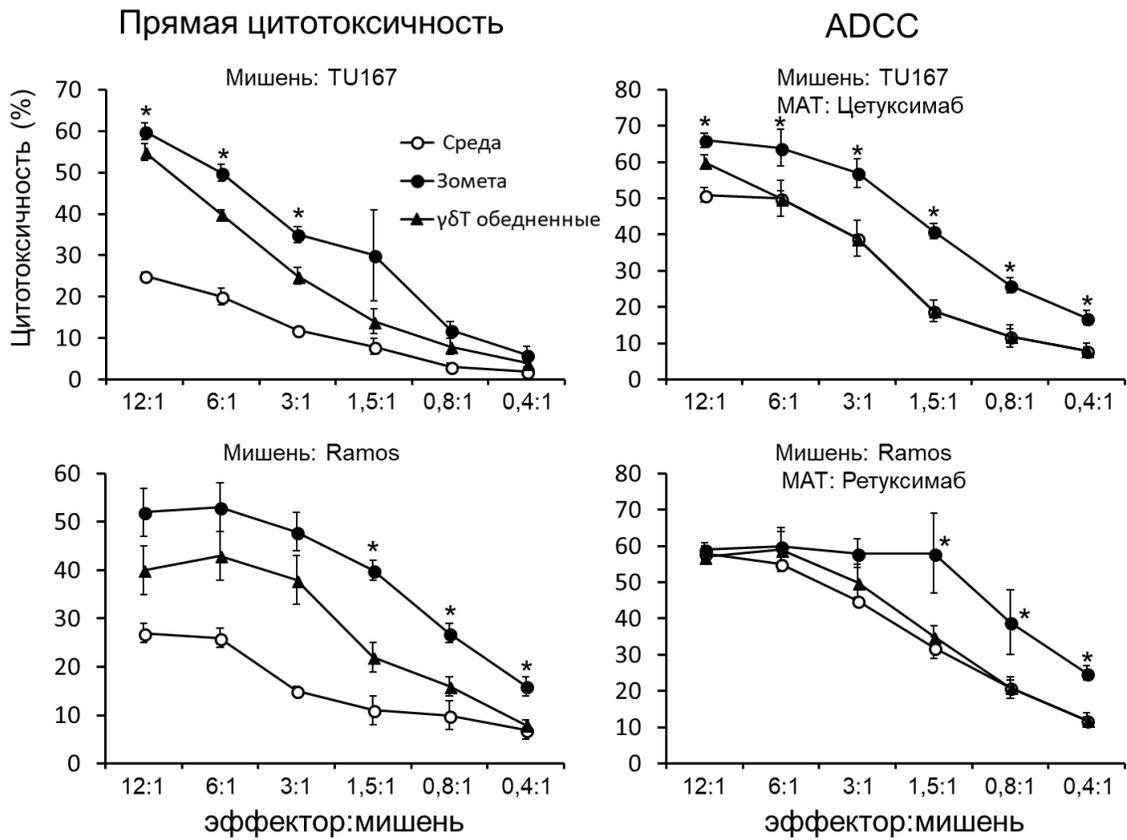


Рисунок 44. Зомета усиливает прямую и антителозависимую НК-цитотоксичность. (С) МКПК культивировались со средой или Зометой. В некоторых группах $\gamma\delta$ Т-лимфоциты удаляли перед началом культивирования с Зометой. Через 96 ч НК-клетки выделяли из клеточных культур и определяли цитотоксическую активность. * – $P > 0,05$ по сравнению с цитотоксичностью НК-клеток, выделенных из популяции МКПК, из которых удалили $\gamma\delta$ Т-лимфоциты.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Костимуляторные молекулы играют важную роль в регуляции иммунного ответа (Sharpe, 2009; Chen and Flies, 2013). В настоящее время выделяют два основных семейства костимуляторных молекул: это семейство В7 и TNF (Podojil and Miller, 2013; Croft, 2014). Молекулы этих семейств могут активировать или ингибировать функциональную активность лимфоцитов в зависимости от взаимодействия комплементарных лигандов и их рецепторов. Это является ключевым механизмом регуляции Т-клеточного иммунитета. Поиск новых молекул, участвующих в костимуляции или ингибировании Т-лимфоцитов, может обеспечить новые подходы для модуляции иммунного ответа при различных патологиях и для дизайна более эффективных вакцин. В настоящей диссертации представлены две новые костимуляторные молекулы (В7-Н3 и ВТNL8). Также в работе описана роль костимуляторных молекул в активации клеток врожденного иммунитета, таких как НК-клетки.

Новая молекула, названная В7-Н3 (В7 homolog 3), имеет 20-25 % а.о., в характерных участках, идентичных с другими членами семейства В7. Так же, как и другие В7 молекулы, В7-Н3 содержит IgV и IgC участки во внеклеточном домене, трансмембранный домен и внутриклеточную часть, которая, как правило, отличается у разных молекул семейства В7 (Linsley *et al.*, 1994). Наличие IgV и IgC у молекул семейства В7 позволяет отнести их к суперсемейству иммуноглобулинов, в которое входит большое количество молекул, участвующих в иммунном ответе, включая антитела, TCR, MHC, НК-рецепторы (Barclay, 2003). Одним из характерных признаков молекул суперсемейства иммуноглобулинов являются 4 консервативных цистеина, которые обеспечивают дисульфидные связи и стабилизируют IgV и IgC участки (Joerger, Du and Linthicum, 1999). Цистеины в определенных позициях также обнаружены у В7-Н3 молекулы. Молекулярная масса В7-Н3 составляет 45-66

кД. В результате дубликации экзонов внеклеточная часть В7-Н3 может быть представлена в виде IgV-IgC (2IgB7-Н3) или IgV-IgC-IgV-IgC (4IgB7-Н3) (Steinberger *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2002). У человека были обнаружены обе изоформы, но наиболее распространена 4IgB7-Н3, в то время как в тканях и клетках мышцы обнаружена только 2IgB7-Н3 (Duan and Huang, 2012). Ген, кодирующий В7-Н3, расположен на 15 хромосоме человека и на 9 хромосоме мышцы (Ling *et al.*, 2003). В7-Н3 – один из наиболее эволюционно консервативных членов семейства В7, который найден у различных видов животных от костистых рыб до млекопитающих (Sun *et al.*, 2011).

Интересно отметить, что мРНК, кодирующая В7-Н3, не обнаруживалась в клетках периферической крови. В то же время мРНК В7-Н3 присутствует в большинстве человеческих тканей, включая тимус, лимфоузлы, селезенку и кишечник. Подтверждением этому является отсутствие экспрессии белка В7-Н3 на поверхности неактивированных клеток периферической крови. Однако стимуляция дендритных клеток и CD14⁺ моноцитов с IFN- γ и GM-CSF соответственно, приводила к экспрессии В7-Н3 на поверхности этих клеток. Это может говорить о том, что экспрессия В7-Н3 проявляется после активации АПК, когда они попадают в ткани или иммунные органы. Похожие профили экспрессии характерны и для других членов семейства В7; В7-Н1, В7-Н2 и В7-Н4 (Dong *et al.*, 1999; Swallow, Wallin and Sha, 1999; Sica *et al.*, 2003). Экспрессия В7-Н3 была обнаружена только на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (моноциты и ДК), стимулированных цитокинами, что еще раз говорит о вовлечении В7-Н3 в регуляцию Т-клеточного иммунного ответа.

Дифференциальная экспрессия костимуляторных молекул в ответ на различные стимуляторы была описана ранее в литературе. IFN- γ и TNF- α индуцируют экспрессию В7-1, но не В7-2 на мышинных фибробластах (Pechhold *et al.*, 1997). Однако после связывания Fc-рецептора на поверхности В-клеток

было обнаружено усиление экспрессии В7-2, но не В7-1 (Lenschow *et al.*, 1994). TNF- α , но не ЛПС, IFN- γ или IL-1 α , селективно усиливал экспрессию мРНК, кодирующую В7-Н1, в 3Т3 клетках (Swallow, Wallin and Sha, 1999). Различная регуляция экспрессии молекул семейства В7, возможно, объясняет наличие множественных молекул с похожими функциями. Хотя мРНК, кодирующая В7-Н3, обнаруживается в различных тканях человека, это не всегда коррелирует с экспрессией белка на поверхности клеток. Так, экспрессия В7-Н3 белка не выявлена на поверхности U937, ТНР-1 и К562 клеток несмотря на присутствие специфических мРНК в этих клеточных линиях. Несоответствие между присутствием мРНК В7-Н3 во многих клетках и ограниченной экспрессии белка В7-Н3 на их поверхности указывает на существование сложных посттранскрипционных механизмов регуляции. Эти механизмы до конца не изучены, однако было показано, что уровень синтеза белка В7-Н3 обратно пропорционален уровню экспрессии miR-29, что указывает на участие микроРНК в регуляции экспрессии В7-Н3 на уровне мРНК (Xu *et al.*, 2009), хотя и другие механизмы могут участвовать в регуляции экспрессии В7-Н3, например, такие как посттрансляционная модификация либо протеолиз (Lindsten *et al.*, 1993; Farrar and Schreiber, 1993).

Наши эксперименты, направленные на определение экспрессии рецептора, связывающегося с В7-Н3, показали, что химерный белок В7-Н3Ig взаимодействует с Т-клетками, находящимися в ранней фазе активации. В7-Н3 не связывался с известными рецепторами семейства, такими как CD28, CTLA-4, ICOS и PD-1. Из этих наблюдений нами был сделан вывод, что В7-Н3 имеет свой специфический рецептор. Природа этого рецептора до сих пор неизвестна, несмотря на то, что с момента нашей публикации об открытии В7-Н3 прошло более 15 лет (Charoval *et al.*, 2001). За это время было сообщено о том, что TLT-2 (TREM-like transcript 2), который экспрессируется на CD4 и CD8 клетках, связывается с В7-Н3 (Hashiguchi *et al.*, 2008). Однако последующие

исследования не подтвердили роль TLT-2 как рецептора B7-H3 (Leitner *et al.*, 2009; Ford and McVicar, 2009). Поиск рецептора для B7-H3 до сих пор остается актуальной задачей, поскольку его идентификация может обеспечить более глубокое понимание функции исследуемого лиганда, а также разработку новых препаратов для практической медицины.

Так как было показано, что B7-H3 связывается с активированными Т-лимфоцитами, следующим логическим шагом была оценка эффекта B7-H3 на функциональную активность Т-клеток. При стимуляции Т-клеток через TCR комплекс с помощью антител против CD3, B7-H3 усиливал пролиферацию Т-лимфоцитов хелперов (CD4+) и киллеров (CD8+). Важно отметить, что только B7-H3Ig, иммобилизованный на планшетах, но не находящийся в растворе, костимулировал Т-лимфоциты. Это говорит о том, что для индукции сигнала через предполагаемый B7-H3 рецептор требуется кросслинкинг множественных рецепторов на поверхности Т-клеток. В дополнение мы показали, что клетки меланомы, трансфицированные B7-H3, усиливают генерацию опухолеспецифических ЦТЛ. Эти результаты дали нам основание для последующих экспериментов по созданию противоопухолевой вакцины, стимулирующей ЦТЛ посредством введения гена, кодирующего B7-H3, в опухолевые клетки.

Одной из наиболее значительных функций B7-H3 является селективное увеличение экспрессии мРНК, кодирующей IFN- γ , и, как следствие, продукции IFN- γ . Именно способность к селективному увеличению продукции IFN- γ отличает B7-H3 от других молекул семейства B7. Например, B7-1 костимулирует продукцию IL-2, IL-4, IL-10 и IFN- γ , в то время как B7-H1 в основном увеличивает продукцию IL-10 и IFN- γ , но не IL-2 и IL-4 (Dong *et al.*, 1999). IFN- γ – ключевой цитокин, вызывающий дифференциацию Th1 клеток и способствующий развитию Т-клеточного иммунного ответа (Farrar and Schreiber, 1993). Способность B7-H3 увеличивать продукцию IFN- γ может

объяснить также и усиленную активацию ЦТЛ после трансфекции опухолевых клеток плазмидой, кодирующей В7-Н3. Таким образом, мы можем предположить, что взаимодействие нового лиганда и рецептора играет роль в регуляции клеточного иммунного ответа при инфекционных и онкологических заболеваниях.

Нами было также показано, что мышьяная молекула В7-Н3 способна усиливать пролиферацию мышьяных Т-лимфоцитов и продукцию IFN- γ . Это дало основание к изучению костимулирующей роли В7-Н3 *in vivo*. Мы показали, что Р815 клетки, трансфицированные В7-Н3, вызывают быструю пролиферацию Р1ЦТЛ *in vitro* и *in vivo* на мышьяной модели. Клональная экспансия Р1А-специфических ЦТЛ в первую очередь происходит в лимфоузлах, дренирующих опухоли, и экспрессия В7-Н3 ускоряет эту экспансию. Следом за этим происходит пролиферация лимфоцитов в селезенке. Таким образом, мы показали, что В7-Н3 индуцирует быструю пролиферацию не только локальных опухолеспецифических ЦТЛ в дренирующих лимфоузлах, но и вызывает системный иммунный ответ в селезенке.

Рецептор для В7-Н3 не экспрессируется на покаящихся Т-лимфоцитах в отличие от CD28. Это дает основание утверждать, что основная роль В7-Н3 заключается в экспансии активированных Т-лимфоцитов, а не в инициации иммунного ответа. Мышьяная модель подтверждает роль В7-Н3 в костимуляции Т-клеток *in vivo*. Однако эти результаты не исключают возможной роли В7-Н3 и в костимуляции наивных ЦТЛ.

На мышьяной модели были подтверждены результаты по костимуляции Т-лимфоцитов опухолями, трансфицированными плазмидой, кодирующей В7-Н3. В работе (Sun *et al.*, 2003) показано, что инъекция плазмиды с геном В7-Н3 в опухоль приводила к регрессии EL4 опухолей, при этом отторжение опухолей было опосредовано CD8+ Т-лимфоцитами и НК-клетками. В наших экспериментах не было получено доказательств роли НК или НКТ клеток в

отторжении опухолей, экспрессирующих B7-H3. Одним из возможных объяснений этого феномена является то, что при инъекции *in vivo* плазида, кодирующая B7-H3, могла попасть в клетки, которые индуцируют активацию НК-клеток, например, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты (Maniар *et al.*, 2010).

Около 50 % мышей отторгали опухоли, которые экспрессируют B7-H3, в то время как на остальных мышах опухоли достигали больших размеров, что приводило к гибели животных. Механизмы, которые обеспечивали уход опухолей от регрессии, на настоящий момент до конца не изучены. Опухоли, растущие на мышах, не теряли экспрессии B7-H3 или MHC I молекул, что исключает возможность клональной селекции вариантов опухолевых клеток, не экспрессирующих B7-H3. Один из возможных механизмов ухода от отторжения – это увеличенное количество регуляторных/супрессорных Т-клеток. Это дало нам основание провести эксперимент, где было показано, что удаление регуляторных клеток с помощью антител против CD25 приводит к ускорению отторжения B7-H3 экспрессирующих опухолей (неопубликованные данные). Недавняя публикация из лаборатории James Allison (США) подтверждает наши результаты (Kreymborg *et al.*, 2015). В то же время нельзя исключить и эффект количества Ag-специфических Т-лимфоцитов, потому что адоптивный перенос P1 ЦТЛ также приводил к регрессии B7-H3 экспрессирующих опухолей у мышей.

Результаты, подтверждающие костимуляторную роль B7-H3, были также получены другими исследовательскими группами. Так, было показано, что отторжение аллогенного трансплантата снижено у мышей с нокаутным B7-H3 геном (Wang *et al.*, 2005b). С использованием мышинной модели аллергической астмы было показано, что МАТ против B7-H3 снижают гиперреактивность дыхательных путей и продукцию цитокинов (Nagashima *et al.*, 2008). Внутриопухолевое введение аденовирусов, содержащих ген, кодирующий B7-H3, приводило к замедлению роста опухолей (Luru *et al.*, 2007). Усиленный

рост опухолей также наблюдался у TRAMP⁺B7-H3^{-/-} мышей в сравнении с TRAMP⁺ мышами с нормальной экспрессией B7-H3 (Kreymborg *et al.*, 2015). Кроме того, B7-H3 показала синергический эффект с триоксидом мышьяка или вазостатиновой генотерапией при экспериментальной терапии H22 гепатоцеллюлярной карциномы (Luo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007). В дополнение, была выявлена положительная корреляция между экспрессией B7-H3 на опухолевых клетках, полученных от пациентов с раком желудка (Wu *et al.*, 2006). Также высокий уровень экспрессии B7-H3 на поверхности клеток рака поджелудочной железы коррелировал с увеличенным количеством опухолеинфильтрирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов и ассоциировался с продлением продолжительности жизни пациентов после хирургического вмешательства (Loos *et al.*, 2009). Все эти результаты говорят о том, что повышенная экспрессия B7-H3 усиливает противоопухолевый иммунный ответ.

В отличие от этих результатов, которые явно указывают на стимулирующее действие B7-H3 на Т-клеточные реакции и противоопухолевый иммунитет, другие исследовательские группы описали ингибирующие функции молекулы. У B7-H3 нокаутных мышей наблюдалось усиление продукции Th1 цитокинов и усиление экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) (Suh *et al.*, 2003). Более того, антитела, блокирующие функцию B7-H3, усиливали пролиферацию Т-клеток *in vitro* и усугубляли ЭАЭ *in vivo* (Prasad *et al.*, 2004). Повышенный уровень B7-H3 экспрессии ассоциировался с 4-кратным увеличением риска прогрессии рака простаты после хирургии (Roth *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2007). Также B7-H3 экспрессия является плохим прогностическим фактором у пациентов с раком почки, раком молочной железы, раком кишечника, раком поджелудочной железы и немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) (Crispen *et al.*, 2008; Arigami *et al.*, 2010; Ingebrigtsen *et al.*, 2014; Yamato *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2006). Результаты этих исследований предполагают, что B7-H3 снижает иммунный ответ против опухолей.

Существует несколько возможных причин, объясняющих противоречивые результаты относительно функции В7-Н3. Во-первых, это наличие стимулирующего и ингибирующего рецепторов, связывающихся с В7-Н3, так же как CD28 (активация) и CTLA4 (ингибирование) взаимодействуют с CD80 и CD86 В7 лигандами. Во-вторых, изоформы В7-Н3 могут проявлять противоположную функциональную активность. В-третьих, экспрессия В7-Н3 на опухолевых клетках может иметь функцию, не связанную с ингибированием иммунных клеток. Было показано, что увеличенная экспрессия В7-Н3 снижает апоптоз клеток рака кишечника (Zhang *et al.*, 2015b). Дальнейшие эксперименты должны помочь определить, в каких ситуациях использование В7-Н3 будет полезным для терапии онкологических и других заболеваний. Наиболее важным является определение рецептора, взаимодействующего с В7-Н3, так как это позволит четко определить внутриклеточные сигнальные пути, запускаемые через В7-Н3. Изучение экспрессии предполагаемого рецептора(ов) также поможет выявить клеточные популяции, реагирующие с В7-Н3, что в свою очередь поможет определить оптимальные стратегии для терапевтического использования В7-Н3.

Нами впервые были получены данные о костимуляторной функции еще одной молекулы, которые представлены в данной диссертации. Недавно было показано, что бутирофилины, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов, также могут играть важную роль в регуляции иммунного ответа (Arnett and Viney, 2014). Молекула, которая описана в данной работе, имеет характеристики молекул, принадлежащих к В7 и бутирофилин семействам, и костимулирует Т-лимфоциты как *in vitro*, так и *in vivo* (Charoval *et al.*, 2013). Интересно отметить, что некоторые молекулы семейства В7, такие как В7-Н1, В7-DC и В7-Н3, изначально были классифицированы (аннотированы) в базах данных как молекулы, подобные бутирофилинам, и только после выявления их иммунологических функций были отнесены к

семейству В7. В представленной диссертации, используя аминокислотные последовательности известных В7 молекул, были обнаружены гомологичные аминокислотные последовательности, аннотированные как В7h.4 (AY358523) или BTNL8 (butyrophilin-like 8; NM 024850). Функции этой молекулы ранее описаны не были.

Бутирофилины и молекулы семейства В7 имеют сходную структуру, характеризующуюся наличием гомологичных IgV и IgC доменов во внеклеточной части (Linsley *et al.*, 1994). Однако внутриклеточная часть большинства молекул, принадлежащих к семейству бутирофилинов, содержит В30.2 домен (Henry *et al.*, 1998). В настоящей диссертации представлены две изоформы BTNL8 молекулы, одна из которых содержит В30.2 домен, а другая нет. Поэтому BTNL8 может представлять связующее звено между семействами бутирофилинов и В7. Экспрессия мРНК, кодирующая обе изоформы BTNL8, обнаружена как в лимфоидных, так и в нелимфоидных органах. Эти результаты подтверждают ранее опубликованные данные (Arnett, Escobar and Viney, 2009; Abeler-Dörner *et al.*, 2012). Это дает основание поставить BTNL8 в список ранее охарактеризованных В7 молекул, таких как В7-Н1, В7-DC, В7-Н2, В7-Н3 и В7-Н4 (Dong *et al.*, 1999; Swallow, Wallin and Sha, 1999; Chapoval *et al.*, 2001; Latchman *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001; Sica *et al.*, 2003; Zang *et al.*, 2003), которые экспрессируются в различных тканях и могут участвовать в регуляции иммунного ответа на периферии.

Присутствие мРНК, кодирующей BTNL8 в нейтрофилах, дает дополнительные основания предполагать, что BTNL8 участвует в регуляции воспалительных процессов в различных органах. Было показано, что нейтрофилы могут инициировать МНС-зависимую, антиген-специфическую активацию Т-лимфоцитов (Beauvillain *et al.*, 2007; Radsak *et al.*, 2000), однако роль костимуляторных молекул, в частности BTNL8, в этом процессе еще предстоит изучить.

Взаимодействие внеклеточной части костимуляторных лигандов со специфическим рецептором играет основную роль в контроле и регуляции иммунного ответа. Для того, чтобы изучить роль BTNL8 в активации Т клеток, нами был сконструирован химерный рекомбинантный белок BTNL8Ig, в котором внеклеточная часть молекулы была соединена с Fc-доменом человеческого иммуноглобулина G. Так как внеклеточная часть обеих изоформ BTNL8 (B7 и бутирофилин) идентична, было заключено, что химерный протеин отражает функциональную активность двух вариантов молекулы. Было показано, что BTNL8Ig взаимодействует с покоящимися, но не с активированными Т-клетками или Т-клеточной линией человека Jurkat. BTNL8Ig не связывается с В-клетками, НК-клетками и моноцитами. Такая экспрессия молекулы, взаимодействующей с BTNL8, не похожа ни на один известный рецептор B7 лигандов. Например, CD28 экспрессируется как на покоящихся, так и на активированных Т-лимфоцитах (Gross, Callas and Allison, 1992), а уровень экспрессии CTLA-4, PD-1 и ICOS увеличивается на поверхности после активации (Agata *et al.*, 1996; Linsley *et al.*, 1996; Hutloff *et al.*, 1999).

Как правило, лиганды суперсемейства иммуноглобулинов взаимодействуют с рецепторами того же суперсемейства. Однако есть и исключения: VTLA – рецептор, который имеет характеристики молекул семейства иммуноглобулинов, экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах, покоящихся В- и НК-клетках (Watanabe *et al.*, 2003; Sedy *et al.*, 2005), взаимодействует с HVEM (herpes virus entry mediator), принадлежащей к семейству TNF молекул (Sedy *et al.*, 2005). Этот факт важен для дальнейшего поиска неизвестных рецепторов, взаимодействующих с лигандами семейства молекул B7 и бутирофилинов. Как было описано в обзоре литературы, рецепторы для многих лигандов семейства B7 не известны. Расширение поля

поиска или использование комбинаторных технологий позволит определить молекулы, взаимодействующие с костимуляторными лигандами.

Результаты, представленные в этой диссертации, подтверждают, что BTNL8 не взаимодействует с CD28, CTLA-4, PD-1 и ICOS. В целом наши данные говорят о том, что BTNL8 может играть важную роль в регуляции наивных Т-клеток, связываясь со своим пока еще неизвестным рецептором. Действительно, нами было показано, что Т-лимфоциты способны пролиферировать и вырабатывать цитокины в ответ на субоптимальную антигенную стимуляцию только в присутствии BTNL8. Костимуляторные свойства BTNL8 молекулы были также подтверждены нами в экспериментах *in vivo*. Результаты, представленные в данной диссертации, доказывают, что BTNL8 принадлежит к группе молекул, которые костимулируют иммунный ответ.

Известно, что набор цитокинов при развитии иммунного ответа определяет дифференциацию и развитие Т-клеток. Например, увеличенная продукция IFN- γ обычно связана с дифференциацией Th1 хелперных клеток, необходимых для активации Т-клеточного иммунитета, в то время как IL-4 и IL-10 помогают развитию Th2 клеток, необходимых для активации гуморального иммунитета (Mosmann and Coffman, 1989). Некоторые костимуляторные молекулы могут индуцировать продукцию либо Th1, либо Th2 цитокинов. Экспериментальные данные показывают, что B7-H2 более эффективен в индукции Th2 цитокинов (Wang *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 1999), в то время как результаты, представленные в данной диссертации, говорят о том, что B7-H3 регулирует продукцию Th1 цитокина IFN- γ и активацию ЦТЛ (Charoval *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004), хотя кросслинкинг CD28 с использованием МАТ или B7-1/B7-2 лигандами вызывает продукцию как Th1, так и Th2 цитокинов (Thompson *et al.*, 1989; McArthur and Raulet, 1993).

Для того чтобы понять особенности регуляции продукции цитокинов BTNL8 молекулой, было проведено изучение продукции IFN- γ , TNF- α , IL-8 и IL-10 Т-лимфоцитами. Было продемонстрировано, что Т-клетки, культивированные в присутствии BTNL8Ig химерного белка или 293НЕК клеток, трансфицированных BTNL8 плазмидой, продуцируют высокие уровни всех тестированных цитокинов, без смещения цитокинового баланса в сторону Th1 или Th2. Это наблюдение было также подтверждено в экспериментах *in vivo*, где мыши, иммунизированные с OVA в присутствии химерного протеина BTNL8Ig, показали увеличенный уровень OVA специфических IgG1 и IgG2a, которые отражают Th2 и Th1 ответы соответственно (Bergstedt-Lindqvist *et al.*, 1988; Bossie and Vitetta, 1991). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что BTNL8, подобно B7-1/B7-2, может костимулировать как Th1, так и Th2 лимфоциты.

Так как рецепторы семейства B7 дифференциально экспрессируются на клетках иммунной системы, было предположено, что различные B7 молекулы участвуют в регуляции разных стадий иммунного ответа. Например, CD28 экспрессируется на покоящихся Т-клетках (Gross, Callas and Allison, 1992), соответственно его лиганды, B7-1 и B7-2, необходимы для активации и пролиферации Т-лимфоцитов во время первичного иммунного ответа, в то время как из-за экспрессии ICOS на активированных Т-клетках (Hutloff *et al.*, 1999) B7-H2 обеспечивает костимуляцию Т-клеток на поздних стадиях первичного или во время вторичного иммунного ответа (Liang and Sha, 2002).

Экспрессия предполагаемого рецептора для BTNL8 на покоящихся, но не на активированных Т-лимфоцитах наводит на мысль, что BTNL8 может играть важную роль в активации наивных Т-клеток. В самом деле, результаты *in vivo* экспериментов показывают, что инъекции BTNL8Ig в момент иммунизации с OVA значительно увеличивали сывороточный уровень OVA специфических IgG во время первичного иммунного ответа. С другой стороны, у мышей,

получавших инъекции BTNL8Ig, не наблюдалось усиленной реакции в ответ на повторное введение антигена. Ранее было показано, что в первые 24–48 часов активации Т-лимфоцитов от мышей, нокаутных по CD28 гену, и контрольных (нормальная экспрессия CD28) наблюдается сходный уровень пролиферации (Green *et al.*, 1994; Lucas *et al.*, 1995); это говорит о том, что другие костимуляторные рецепторы, отличные от B7-1/B7-2/CD28, участвуют в активации наивных Т-лимфоцитов.

Наши результаты предполагают, что BTNL8, взаимодействуя с его рецептором, может обеспечивать костимуляторный сигнал для активации наивных Т-лимфоцитов, что приводит к активации первичного, но не вторичного иммунного ответа. Более того, сигнал от BTNL8 молекулы не имеет долгосрочных эффектов, так как в наших экспериментах не было обнаружено влияния BTNL8Ig инъекции на усиление и генерацию антиген-специфической памяти. Это свойство BTNL8 молекулы может быть особенно важным для иммунотерапии онкологических заболеваний, так как активация сильного первичного иммунного ответа против собственных антигенов, ассоциированных с опухолями, без генерации длительного иммунитета, возможно, снизит вероятность развития тяжелых аутоиммунных последствий.

В представленной диссертации описаны две формы молекулы BTNL8, которые имеют характеристики классических членов семейства B7 и BTN. Физиологическое значение наличия двух BTNL8 изоформ в настоящее время не известно. Возможно, что разные внутриклеточные участки молекул обеспечивают активацию различных сигнальных путей, что может приводить к разным физиологическим процессам. Высокий уровень экспрессии мРНК, кодирующей BTNL8 в нейтрофилах и различных тканях, предполагает участие BTNL8 в костимуляции первичного иммунного ответа на периферии, в участках воспаления. Таким образом, манипуляция BTNL8 молекулой в момент начала иммунного ответа может обеспечить новые возможности для лечения

вирусных инфекций, онкологических заболеваний и отторжения трансплантируемых органов.

Кроме суперсемейства иммуноглобулинов молекулы, принадлежащие к семейству TNF (Tumor Necrosis Factor), также играют важную роль в костимуляции и регуляции иммунного ответа. К таким молекулам относятся OX40, CD27, GITR, DR3, CD30, CD137, TACI и др. (Croft, 2014). Принято считать, что костимуляторные молекулы играют основную роль в регуляции Т-клеточного звена иммунного ответа. Как уже обсуждалось выше, концепция костимуляции вытекает из 2-сигнальной модели активации Т-лимфоцитов, где первый сигнал обеспечивается взаимодействием комплекса МНС/пептид с Т-клеточным рецептором, а второй сигнал подается через костимуляторные молекулы. Роль костимуляторных молекул в регуляции функциональной активности других клеток иммунной системы малоизучена. В представленной диссертации исследовалась роль CD137 (4-1BB) в регуляции цитотоксической активности NK-клеток. Несмотря на то, что эффект CD137 на активацию цитотоксических Т-лимфоцитов хорошо изучен (Kim, Han and Broxmeyer, 2008), наши результаты впервые доказывают, что взаимодействие CD137 и CD137L может костимулировать противоопухолевую активность NK-клеток после прайминга с hIgG1. Это наблюдение говорит о том, что второй сигнал через CD137 костимуляторные рецептор также нужен для оптимальной активации NK-клеток. Это феномен может быть использован для улучшения существующих методов терапии онкологических заболеваний, где терапия с использованием МАТ против ОАА комбинируется с CD137 агонистами, что обеспечивает усиление прямой и антителозависимой клеточной цитотоксичности NK-клеток.

Еще одно важное наблюдение, представленное в диссертации, касается экспрессии костимуляторных лигандов, в частности, CD137L на $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах. Как обсуждалось выше, экспрессия костимуляторных лигандов во

многим определяет функцию молекулы. Экспрессия лигандов в центральных органах иммунной системы подразумевает их участие в дифференциации и первичной активации иммунных клеток, в то время как присутствие костимуляторных лигандов в периферических органах иммунной системы и других тканях определяет поддержку и завершение иммунного ответа после уничтожения патогена. Этот факт позволяет сделать заключение, что экспрессия CD137L на $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах, присутствующих во многих органах, необходима для поддержки иммунного ответа в тканях во время элиминации патогена.

Результаты, представленные в данной диссертации, также свидетельствуют о том, что комбинированное введение *in vitro* активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов или инъекции агентов, стимулирующих $\gamma\delta$ Т-клетки, таких как бисфосфонаты или золедронат (Hebbeler *et al.*, 2007; Dieli *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2003), с противоопухолевыми Ат может улучшить клинический результат терапии через усиление прямой и антителозависимой цитотоксичности NK-клеток.

При культивировании NK-клеток с 293HEK клетками, экспрессирующими CD137L, было обнаружено, что взаимодействие CD137 и CD137L обуславливает активацию NK-клеток. Однако блокирование взаимодействия CD137 и CD137L при культивировании NK-клеток с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами вызывало лишь частичное снижение активации NK-клеток. Это наблюдение наводит на мысль, что другие костимуляторные молекулы могут участвовать в регуляции функциональной активности NK-клеток. Было показано, что активация NK-клеток может быть запущена с помощью CD80 или CD86 (Martín-Fontecha *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999), однако в наших экспериментах экспрессия рецепторов для этих лигандов на поверхности NK-клеток не была обнаружена. Более того, CTLA4Ig химерный белок не блокировал активацию NK-клеток в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов; это

означает, что CD80 и CD86 не участвуют в активации NK-клеток, по крайней мере в экспериментальных моделях, описанных в данной диссертации. В противоположность ранее опубликованным результатам, описывающим экспрессию и функцию ICOS на мышинных NK-клетках (Ogasawara, Yoshinaga and Lanier, 2002), мы не обнаружили наличия ICOS на NK-клетках человека. В целом результаты предполагают, что другие костимуляторные молекулы (не B7-1, B7-2 и B7-H2), экспрессирующиеся на поверхности $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, могут участвовать в регуляции противоопухолевой активности NK-клеток. Выявление этих молекул поможет повысить эффективность иммунотерапии онкологических заболеваний, основанную на использовании моноклональных антител и NK-клеток.

Активированные NK and CD8 Т-клетки экспрессируют NKG2D рецептор, который взаимодействует со специфическими лигандами (ULBPs и MIC A/B), присутствующими на поверхности опухолевых клеток (Nausch and Cerwenka, 2008). Было также показано, что CD137 может регулировать экспрессию NKG2D на CD8 Т-лимфоцитах человека (Kim, Han and Broxmeyer, 2008). Результаты, представленные в данной диссертации, показывают, что CD137 регулирует экспрессию NKG2D рецептора на NK-клетках, культивированных в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Более того, антитела против NKG2D значительно снижали цитотоксическую активность стимулированных NK-клеток против различных опухолевых мишеней; это указывает на то, что повышение экспрессии NKG2D, вызванное взаимодействием с CD137, обуславливает усиление цитолитической активности NK-клеток. Однако возможно, что другие молекулы, экспрессируемые на активированных NK-клетках, также вовлечены в лизис опухолевых мишеней, так как антитела против NKG2D не полностью блокировали цитотоксичность.

Предварительные эксперименты показали, что длительное культивирование (14 дней) МКПК с агентами, вызывающими активацию $\gamma\delta$ Т-

лимфоцитов (IPR + IL-2), усиливает цитолитическую активность НК-клеток (Alexander *et al.*, 2008). Эта активация была опосредована растворимыми факторами, секретируемыми $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами. Однако краткосрочное культивирование (48 ч) НК-клеток с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами требовало примирования с hIgG1и межклеточного взаимодействия для активации НК-клеток. Эти наблюдения говорят о том, что существуют различные механизмы регуляции функциональной активности НК-клеток $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами. Физиологическая роль взаимодействия НК- и Т-клеток в развитии иммунного ответа требует дальнейшего изучения.

Клиническое значение взаимодействия НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов было подтверждено в экспериментах, где МКПК культивировали с реагентами, которые используются для терапии пациентов с лимфомой и плоскоклеточной карциномой головы и шеи. Результаты, представленные в данной диссертации, показывают, что культивирование МКПК с Зометой, также используемой для терапии онкологических больных и способной стимулировать $\gamma\delta$ Т лимфоциты, приводило к увеличению ADCC и прямой НК-цитотоксичности против клеток лимфомы и плоскоклеточной карциномой головы и шеи. Вероятно, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты играют важную роль в регуляции ADCC, так как их удаление перед началом культивирования с Зометой снижало цитотоксичность до контрольного уровня, в то время как удаление $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов лишь частично снижало прямую НК-цитотоксичность. Эти результаты также указывают на существование других молекулярных и клеточных мишеней золедроновой кислоты помимо $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, которые могут быть вовлечены в активацию прямой НК-цитотоксичности. В целом результаты говорят о том, что инъекции агентов, активирующих $\gamma\delta$ Т-лимфоциты (например, Зомета), могут усилить противоопухолевую активность таких препаратов, как Цетуксимаб и Ритуксимаб, которые используются для терапии пациентов с В-клеточной лимфомой и плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

Известно, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, активированные *in vitro*, могут усиливать специфический иммунный ответ против опухолей, представляя опухолевые антигены $\alpha\beta$ Т-клеткам (Brandes *et al.*, 2009; Brandes, Willimann and Moser, 2005). Результаты, представленные в данной работе, показывают, что агенты, способные активировать $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, такие как IPP и Зомета, также могут улучшать противоопухолевую функцию врожденной иммунной системы, как было определено с помощью измерения цитотоксической активности НК-клеток. Таким образом, активация $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов *in vitro* или адаптивный перенос *in vivo* активированных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов может улучшить существующие методы иммунотерапии рака. В частности, комбинирование опухолеспецифических МАТ, которые взаимодействуют с Fc-рецептором на НК-клетках (Цетуксимаб и Ритуксимаб) (Taylor *et al.*, 2009) и агентов, активирующих $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, применяемых в клиниках (Зомета) (Pandya *et al.*, 2010; Kunzmann, Bauer and Wilhelm, 1999), может улучшить иммунотерапию рака через активацию адаптивного и врожденного иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены новые молекулы В7-Н3 и BTNL8, обладающие уникальными иммунологическими свойствами, расширяющими наши представления об участии костимуляторных молекул в регуляции иммунного ответа. Результаты работы позволили предложить новые стратегии для таргетной иммунотерапии онкологических заболеваний, основанные на распознавании новых молекул моноклональными антителами, а также блокировки их функциональной активности.
2. Для анализа функциональной активности исследуемых молекул получены рекомбинантные белки В7-Н3Ig и BTNL8Ig, ряд опухолевых клеточных линий, трансфицированных плазмидами, кодирующими эти костимуляторные молекулы, а также специфические моноклональные антитела.
3. Показано, что молекула В7-Н3, которая имеет аминокислотную гомологию с В7-1, В7-2, В7-Н1 и В7-Н2, что определяет ее принадлежность к семейству В7. Выяснено, что В7-Н3 лиганд экспрессируется на поверхности антигенпрезентирующих клеток, а его рецептор – на поверхности Т-лимфоцитов. Взаимодействие В7-Н3 с предполагаемым рецептором вызывает повышение продукции IFN- γ и усиливает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов.
4. Экспрессия В7-Н3 на поверхности опухолевых клеток приводит к их отторжению и развитию долговременной иммунологической памяти против опухолевых антигенов.
5. Выявлено, что внеклеточная часть BTNL8 имеет аминокислотную последовательность, гомологичную известным В7 молекулам, в то время как цитоплазматическая часть молекулы содержит В30.2 домен, который характерен молекулам, принадлежащих к семейству бутирофилинов.

6. Впервые показано, что BTNL8 способна стимулировать пролиферацию и продукцию INF- γ , IL-8, IL-10 и TNF- α Т-лимфоцитами. Введение мышам рекомбинантного белка BTNL8Ig усиливает продукцию антиген-специфических IgG1 и IgG2a во время первичного, но не вторичного иммунного ответа.
7. Продемонстрирована ранее не известная функция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов индуцировать НК-опосредованный лизис опухолевых клеток. Показано, что для оптимальной активации НК-клеток, подобно активации Т-лимфоцитов, требуются два сигнала: первый обеспечивается Fc-рецептором, второй – костимуляторными молекулами, в частности CD137.

ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Одним из самых важных и интересных направлений развития исследований функциональной активности B7-H3 и BTNЛ8 лигандов является поиск их специфических рецепторов. Обнаружение рецепторов и развитие молекулярных инструментов для управления костимуляцией может позволить разработать новые стратегии для терапии аутоиммунных заболеваний и иммунотерапии рака. Костимуляторные молекулы могут также помочь повысить эффективность существующих вакцин через усиление положительных сигналов и блокировку ингибирующих путей. Использование B7-H3 поможет увеличить продукцию Th1 цитокинов, которые необходимы для дифференциации и активации Т-клеточного иммунитета. Стимуляция с применением BTNЛ8 лиганда может обеспечить значительную активацию первичного иммунного ответа.

Агенты, активирующие $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, такие как бисфосфонаты (Зомета), которые в настоящее время применяются в клиниках, могут быть использованы в качестве иммуномодулирующих препаратов для усиления естественного иммунного ответа против опухолей. Комбинирование таких препаратов с моноклональными антителами, также применяемыми в клиниках (Цетуксимаб и Ритуксимаб), может улучшить иммунотерапию рака через активацию адаптивного и естественного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммуноterapia опухолей основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпунктов»). // Медицинская иммунология – – 2015. – Т. 17. – № 5. – С. 395-406.
2. Луговской А.А. Инженерия терапевтических антител: Теория и практика // Молекулярная биология – 2017. – Т. 51. – № 6. – С. 886-898.
3. Abeler-Dörner L., Swamy M., Williams G., Hayday A.C., Bas A. Butyrophilins: an emerging family of immune regulators // Trends Immunol. – – 2012. – V. 33. – N. 1. – P. 34-41.
4. Agarwal S., Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation // Immunity. – 1998. – V. 9. – N. 6. – P. 765-775.
5. Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H., Ishida Y., Tsubata T., Yagita H., Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes // Int. Immunol – 1996. – V.8. – N. 5. – P. 765-772.
6. Ahmadzadeh M., Johnson L.A., Heemskerk B., Wunderlich J.R., Dudley M.E., White D.E., Rosenberg S.A. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired // Blood – 2009. – V. 114. – N. 8. – P. 1537-44.
7. Ahmed M., Cheng M., Zhao Q., Goldgur Y., Cheal S.M., Guo H.F., Larson S.M., Cheung N. K. Humanized Affinity-matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Antitumor Activity and Binds to FG Loop of Tumor Antigen B7-H3 // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – N. 50. – P. 30018-30029.
8. Akiba H., Takeda K., Kojima Y., Usui Y., Harada N., Yamazaki T., Ma J., Tezuka K., Yagita H., Okumura K. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular

- B helper T cell maintenance in vivo // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175. – N. 4. – P. 2340-2348.
9. Alegre M.L., Noel P.J., Eisfelder B.J., Chuang E., Clark M.R., Reiner S.L., Thompson C.B. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells // *J. Immunol.* – 1996. – V. 157. – N. 11. – P. 4762-4770.
 10. Alexander A.A., Maniar A., Cummings J.S., Hebbeler A.M., Schulze D.H., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., Chapoval A.I. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ $\{\gamma\}\{\delta\}$ T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma // *Clin. Cancer. Res.* – 2008. – V. 14. – N. 13. – P. 4232-40.
 11. Ammann J.U., Cooke A., Trowsdale J. Butyrophilin Btn2a2 inhibits TCR activation and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway signaling and induces Foxp3 expression in T lymphocytes // *J. Immunol.* – 2013. – V. 190. – N. 10. – P. 5030-5036.
 12. Ansari M.J., Fiorina P., Dada S., Guleria I., Ueno T., Yuan X., Trikudanathan S., Smith R. N., Freeman G., Sayegh M.H. Role of ICOS pathway in autoimmune and alloimmune responses in NOD mice // *Clin. Immunol.* – 2008. – V. 126. – N. 2 – P. 140-147.
 13. Ansari M.J., Salama A.D., Chitnis T., Smith R. N., Yagita H., Akiba H., Yamazaki T., Azuma M., Iwai H., Khoury S.J., Auchincloss H., Sayegh M.H. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198. – N. 1. – P. 63-69.
 14. Arigami T., Narita N., Mizuno R., Nguyen L., Ye X., Chung A., Giuliano A.E., Hoon D.S. B7-h3 ligand expression by primary breast cancer and associated with regional nodal metastasis // *Ann. Surg.* – 2010. – V. 252. – N. 6. – P. 1044-1051.

15. Arnett H.A., Escobar S.S., Gonzalez-Suarez E., Budelsky A.L., Steffen L.A., Boiani N., Zhang M., Siu G., Brewer A.W., Viney J.L. BTNL2 a butyrophilin/B7-like molecule is a negative costimulatory molecule modulated in intestinal inflammation // *J Immunol* – 2007. – V.178. – N. 3. – P. 1523-1533.
16. Arnett H.A., Escobar S.S., Viney J.L. Regulation of costimulation in the era of butyrophilins // *Cytokine* – 2009. – V. 46. – N. 3. – P. 370-375.
17. Arnett H.A., Viney J.L. Immune modulation by butyrophilins // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – V.14. – N. 8. – P. 559-569.
18. Azuma M., Ito D., Yagita H., Okumura K., Phillips J.H., Lanier L.L., Somoza C.B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28 // *Nature.* – 1993. – V.366. – N. 6450. – P.7 6-89.
19. Baessler T., Charton J.E., Schmiedel B.J., Grünebach F., Krusch M., Wacker A., Rammensee H.G., Salih H.R. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells // *Blood.* – 2010. – V. 115. – N. 15. – P. 3058-3069.
20. Bajorath J., Peach R.J., Linsley P.S. Immunoglobulin fold characteristics of B7-1(CD80) and B7-2 (CD86) // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3. – N. 11. – P. 2148-2150.
21. Barbee S.D., Woodward M.J., Turchinovich G., Mention J.J., Lewis J.M., Boyden L.M., Lifton R.P., Tigelaar R., Hayday A.C. Skint-1 is a highly specific unique selecting component for epidermal T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2011. – V. 108. – N. 8. – P. 3330-3335.
22. Barclay A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules // *Semi N. Immunol.* – 2003. – V. 15. – N. 4. – P. 215-223.
23. Bas A., Swamy M., Abeler-Dörner L., Williams G., Pang D.J., Barbee S.D., Hayday A.C. Butyrophilin-like 1 encodes an enterocyte protein that selectively

- regulates functional interactions with T lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2011. – V. 108. – N. 11. – P. 4376-4381.
24. Beauvillain C., Delneste Y., Scotet M., Peres A., Gascan H., Guermonprez P., Barnaba V., Jeannin P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo // *Blood*. – 2007. – V. 110. – N. 8. – P. 2965-2973.
 25. Beier K.C., Hutloff A., Dittrich A.M., Heuck C., Rauch A., Büchner K., Ludewig B., Ochs H.D., Mages H.W., Kroczeck R.A. Induction binding specificity and function of human ICOS // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – V. 30. – N. 12. – P. 3707-3717.
 26. Bergstedt-Lindqvist S., Moon H.B., Persson U., Möller G., Heusser C., Severinson E. Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE // *Eur. J. Immunol.* – 1988. – V. 18. – N. 7. – P. 1073-1077.
 27. Bertram E.M., Tafuri A., Shahinian A., Chan V.S., Hunziker L., Recher M., Ohashi P.S., Mak T.W., Watts T.H. Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – V. 32. – N. 12. – P. 3376-3385.
 28. Bharaj P., Chahar H.S., Alozie O.K., Rodarte L., Bansal A., Goepfert P.A., Dwivedi A., Manjunath N., Shankar P. Characterization of programmed death-1 homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – N. 10. – P. e109103.
 29. Borghaei H., Paz-Ares L., Horn L., Spigel D.R., Steins M., Ready N. E., Chow L.Q., Vokes E.E., Felip E., Holgado E., Barlesi F., Kohlhäufel M., Arrieta O., Burgio M.A., Fayette J., Lena H., Poddubskaya E., Gerber D.E., Gettinger S. N., Rudin C.M., Rizvi N., Crinò L., Blumenschein G.R., Antonia S.J., Dorange C., Harbison C.T., Graf Finckenstein F., Brahmer J.R. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – V. 373. – N. 17. – P. 1627-1639.
 30. Borriello F., Freeman G.J., Edelhoff S., Disteche C.M., Nadler L.M., Sharpe A.H. Characterization of the murine B7-1 genomic locus reveals an additional

- exon encoding an alternative cytoplasmic domain and a chromosomal location of chromosome 16 band B5 // *J. Immunol.* – 1994. – V. 153. – N. 11. – P. 5038-5048.
31. Borriello F., Oliveros J., Freeman G.J., Nadler L.M., Sharpe A.H. Differential expression of alternate mB7-2 transcripts // *J. Immunol.* – 1995. – V. 155. – N. 12. – P. 5490-5497.
 32. Bossaller L., Burger J., Draeger R., Grimbacher B., Knoth R., Plebani A., Durandy A., Baumann U., Schlesier M., Welcher A.A., Peter H.H., Warnatz K. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells // *J. Immunol.* – 2006. – V. 177. – N. 7. – P. 4927-4932.
 33. Bossie A., Vitetta E.S. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching // *Cell. Immunol.* – 1991. – V. 135. – N. 1. – P. 95-104.
 34. Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q., Hwu W.J., Topalian S.L., Hwu P., Drake C.G., Camacho L.H., Kauh J., Odunsi K., Pitot H.C., Hamid O., Bhatia S., Martins R., Eaton K., Chen S., Salay T.M., Alaparthi S., Grosso J.F., Korman A.J., Parker S.M., Agrawal S., Goldberg S.M., Pardoll D.M., Gupta A., Wigginton J.M. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – V. 366. – N. 26. – P. 2455-2465.
 35. Brandes M., Willimann K., Bioley G., Lévy N., Eberl M., Luo M., Tampé R., Lévy F., Romero P., Moser B. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alpha beta T cell responses // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2009. – V. 106. – N. 7. – P. 2307-2312.
 36. Brandes M., Willimann K., Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells // *Science.* – 2005. – V. 309. – N. 5732 – P. 264-268.

37. Brandt C.S., Baratin M., Yi E.C., Kennedy J., Gao Z., Fox B., Haldeman B., Ostrander C.D., Kaifu T., Chabannon C., Moretta A., West R., Xu W., Vivier E., Levin S.D. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans // *J. Exp. Med.* – 2009. – V. 206. – N. 7. – P. 1495-1503.
38. Breitfeld D., Ohl L., Kremmer E., Ellwart J., Sallusto F., Lipp M., Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5 localize to B cell follicles and support immunoglobulin production // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – N. 11. – P. 1545-1552.
39. Brodie D., Collins A.V., Iaboni A., Fennelly J.A., Sparks L.M., Xu X. N., van der Merwe P.A., Davis S.J. LICOS a primordial costimulatory ligand? // *Curr. Biol.* – 2000. – V. 10. – N. 6. – P. 333-336.
40. Brunet J.F., Denizot F., Luciani M.F., Roux-Dosseto M., Suzan M., Mattei M.G., Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4 // *Nature.* – 1987. – V. 328. – N. 6127. – P. 267-270.
41. Butte M.J., Keir M.E., Phamduy T.B., Sharpe A.H., Freeman G.J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses // *Immunity.* – 2007. – V. 27. – N. 1. – P. 111-122.
42. Byers J.T., Paniccia A., Kaplan J., Koenig M., Kahn N., Wilson L., Chen L., Schulick R.D., Edil B.H., Zhu Y. Expression of the Novel Costimulatory Molecule B7-H5 in Pancreatic Cancer // *An N. Surg. Oncol.* – 2015. – V. 22 Suppl 3. – P. 1574-1579.
43. Cao G., Wang J., Zheng X., Wei H., Tian Z., Sun R. Tumor Therapeutics Work as Stress Inducers to Enhance Tumor Sensitivity to Natural Killer (NK) Cell Cytolysis by Up-regulating NKp30 Ligand B7-H6 // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – N. 50. – P. 29964-29973.
44. Chapoval A.I., Ni J., Lau J.S., Wilcox R.A., Flies D.B., Liu D., Dong H., Sica G.L., Zhu G., Tamada K., Chen L. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell

- activation and IFN-gamma production // *Nat. Immunol.* – 2001. – V. 2. – N. 3. – P. 269-274.
45. Chapoval A.I., Smithson G., Brunick L., Mesri M., Boldog F.L., Andrew D., Khramtsov N. V., Feshchenko E.A., Starling G.C., Mezes P.S. BTNL8 a butyrophilin-like molecule that costimulates the primary immune response // *Mol. Immunol.* – 2013. – V. 56. – N. 4. – P. 819-828.
46. Chen J.T., Chen C.H., Ku K.L., Hsiao M., Chiang C.P., Hsu T.L., Chen M.H., Wong C.H. Glycoprotein B7-H3 overexpression and aberrant glycosylation in oral cancer and immune response // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2015a. – V. 112. – N. 42. – P. 13057-13062.
47. Chen L., Ashe S., Brady W.A., Hellström I., Hellström K.E., Ledbetter J.A., McGowan P., Linsley P.S. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4 // *Cell.* – 1992. – V. 71. – N. 7. – P. 1093-1102.
48. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – V. 13. – N. 4. – P. 227-242.
49. Chen W., Hou Z., Li C., Xiong S., Liu H. Cloning and characterization of porcine 4Ig-B7-H3: a potent inhibitor of porcine T-cell activation // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – N. 6. – P. e21341.
50. Chen X., Quinn E.M., Ni H., Wang J., Blankson S., Redmond H.P., Wang J.H., Feng X. B7-H3 participates in the development of experimental pneumococcal meningitis by augmentation of the inflammatory response via a TLR2-dependent mechanism // *J. Immunol.* – 2012. – V. 189. – N. 1. – P. 347-355.
51. Chen Z.R., Zhang G.B., Wang Y.Q., Yan Y.D., Zhou W.F., Zhu C., Chen Y., Wang J., Ji W. Therapeutic effects of anti-B7-H3 antibody in an ovalbumin-induced mouse asthma model // *An N. Allergy. Asthma. Immunol.* – 2013. – V. 111. – N. 4. – P. 276-281.

52. Chen Z., Zhang G., Wang Y., Yan Y., Zhu C., Huang L., Wang M., Hao C., Ji W. B7-H3 expression in children with asthma exacerbation // *Allergy Asthma Proc* – 2015b. – V.36. – N. 4 – P.37-43.
53. Cheng H., Janakiram M., Borczuk A., Lin J., Qiu W., Liu H., Chinai J.M., Halmos B., Perez-Soler R., Zang X. HHLA2 a New Immune Checkpoint Member of the B7 Family Is Widely Expressed in Human Lung Cancer and Associated with EGFR Mutational Status // *Clin. Cancer. Res.* – 2017. – V. 23. – N. 3. – P. 825-832.
54. Chester C., Sanmamed M.F., Wang J., Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale clinical results and future strategies // *Blood.* – 2018. – V. 131. – N. 1. – P. 49-57.
55. Choi I.H., Zhu G., Sica G.L., Strome S.E., Cheville J.C., Lau J.S., Zhu Y., Flies D.B., Tamada K., Chen L. Genomic organization and expression analysis of B7-H4 an immune inhibitory molecule of the B7 family // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – N. 9. – P. 4650-4654.
56. Collins M., Ling V., Carreno B.M. The B7 family of immune-regulatory ligands // *Genome Biol.* – 2005. – V. 6. – N. 6. – P. 223.
57. Compte E., Pontarotti P., Collette Y., Lopez M., Olive D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – V. 34. – N. 8. – P. 2089-2099.
58. Coyle A.J., Lehar S., Lloyd C., Tian J., Delaney T., Manning S., Nguyen T., Burwell T., Schneider H., Gonzalo J.A., Gosselin M., Owen L.R., Rudd C.E., Gutierrez-Ramos J.C. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses // *Immunity.* – 2000. – V. 13. – N. 1. – P. 95-105.
59. Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C. The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma // *Springer Semi N. Immunopathol.* – 2004. – V. 25. – N. 34 – P. 349-359.

60. Crispen P. L., Sheinin Y., Roth T.J., Lohse C.M., Kuntz S.M., Frigola X., Thompson R.H., Boorjian S.A., Dong H., Leibovich B.C., Blute M.L., Kwon E.D. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – V. 14. – N. 16. – P. 5150-5157.
61. Croft M. The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions // *Semin Immunol* – 2014. – V. 26. – N. 3. – P. 183-190.
62. Cubillos-Ruiz J.R., Martinez D., Scarlett U.K., Rutkowski M.R., Nesbeth Y.C., Camposeco-Jacobs A.L., Conejo-Garcia J.R. CD277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells // *Oncotarget* – 2010. – V. 1. – N. 5. – P. 329-338.
63. Dangaj D., Scholler N. Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses // *Oncoimmunology* – 2013. – V. 2. – N. 8 – P. e25913.
64. Dieli F., Vermijlen D., Fulfaro F., Caccamo N., Meraviglia S., Cicero G., Roberts A., Buccheri S., D'Asaro M., Gebbia N., Salerno A., Eberl M., Hayday A.C. Targeting human $\{\gamma\}\delta\}$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – N. 15. – P. 7450-7457.
65. Dong C., Juedes A.E., Temann U.A., Shresta S., Allison J.P., Ruddle N. H., Flavell R.A. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function // *Nature.* – 2001. – V. 409. – N. 6816. – P. 97-101.
66. Dong C., Temann U.A., Flavell R.A. Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions // *J. Immunol.* – 2001. – V. 166. – N. 6. – P. 3659-3662.

67. Dong H., Zhu G., Tamada K., Chen L. B7-H1 a third member of the B7 family co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5. – N. 12. – P. 1365-1369.
68. Duan H., Huang M. Genome-wide identification and evolutionary analysis of B7-H3 // *Int. J. Data. Min. Bioinform.* – 2012. – V. 6. – N. 3. – P. 292-303.
69. Farrar M.A., Schreiber R.D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor // *Annu. Rev. Immunol.* – 1993. – V. 11 – P. 571-611.
70. Fiegler N., Textor S., Arnold A., Rölle A., Oehme I., Breuhahn K., Moldenhauer G., Witzens-Harig M., Cerwenka A. Downregulation of the activating NKp30 ligand B7-H6 by HDAC inhibitors impairs tumor cell recognition by NK cells // *Blood.* – 2013. – V. 122. – N. 5. – P. 684-693.
71. Finck B.K., Linsley P. S., Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig // *Science.* – 1994. – V. 265. – N. 5176. – P. 1225-1227.
72. Fitzgerald L.M., Kumar A., Boyle E.A., Zhang Y., McIntosh L.M., Kolb S., Stott-Miller M., Smith T., Karyadi D.M., Ostrander E.A., Hsu L., Shendure J., Stanford J.L. Germline missense variants in the BTNL2 gene are associated with prostate cancer susceptibility // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* – 2013. – V. 22. – N. 9. – P. 1520-1528.
73. Flajnik M.F., Tlapakova T., Criscitiello M.F., Krylov V., Ohta Y. Evolution of the B7 family: co-evolution of B7H6 and NKp30 identification of a new B7 family member B7H7 and of B7's historical relationship with the MHC // *Immunogenetics.* – 2012. – V. 64. – N. 8. – P. 571-590.
74. Flem-Karlsen K., Fodstad Ø., Tan M., Nunes-Xavier C.E. B7-H3 in Cancer - Beyond Immune Regulation // *Trends Cancer.* – 2018. – V. 4. – N. 6. – P. 401-404.
75. Flies D.B., Higuchi T., Chen L. Mechanistic Assessment of PD-1H Coinhibitory Receptor-Induced T Cell Tolerance to Allogeneic Antigens // *J. Immunol.* – 2015. – V. 194. – N. 11. – P. 5294-5304.

76. Flies D.B., Wang S., Xu H., Chen L. Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the programmed death-1 homolog prevents graft-versus-host disease in mouse models // *J. Immunol.* – 2011. – V. 187. – N. 4. – P. 1537-1541.
77. Ford J.W., McVicar D.W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – V. 21. – N. 1. – P. 38-46.
78. Franke W.W., Heid H.W., Grund C., Winter S., Freudenstein C., Schmid E., Jarasch E.D., Keenan T.W. Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein: specific location in apical regions of lactating epithelial cells // *J. Cell. Biol.* – 1981. – V. 89. – N. 3. – P. 485-494.
79. Freeman G.J., Freedman A.S., Segil J.M., Lee G., Whitman J.F., Nadler L.M. B7 a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells // *J. Immunol.* – 1989. – V. 143. – N. 8. – P. 2714-2722.
80. Freeman G.J., Gray G.S., Gimmi C.D., Lombard D.B., Zhou L.J., White M., Fingerroth J.D., Gribben J.G., Nadler L.M. Structure expression and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7 // *J. Exp. Med.* – 1991. – V. 174. – N. 3. – P. 625-631.
81. Freeman G.J., Gribben J.G., Boussiotis V. A., Ng J.W., Restivo V. A., Lombard L.A., Gray G.S., Nadler L.M. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation // *Science.* – 1993. – V. 262. – N. 5135. – P. 909-911.
82. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L.J., Malenkovich N. , Okazaki T., Byrne M.C., Horton H.F., Fouser L., Carter L., Ling V. , Bowman M.R., Carreno B.M., Collins M., Wood C.R., Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – N. 7. – P. 1027-1034.
83. Garcia C.A., Martin M., Michalek S.M. Role of B7 costimulatory molecules in mediating systemic and mucosal antibody responses to attenuated *Salmonella*

- enterica serovar Typhimurium and its cloned antigen // *Infect. Immun.* – 2004. – V. 72. – N. 10. – P. 5824-5831.
84. Gotsman I., Gracie N., Gupta R., Dacosta R., MacConmara M., Lederer J., Sukhova G., Witztum J.L., Sharpe A.H., Lichtman A.H. Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule // *Circulation.* – 2006. – V. 114. – N. 19 – P. 2047-2055.
85. Green J.M., Noel P. J., Sperling A.I., Walunas T.L., Gray G.S., Bluestone J.A., Thompson C.B. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice // *Immunity.* – 1994. – V. 1. – N. 6. – P. 501-508.
86. Green K.A., Wang L., Noelle R.J., Green W.R. Selective Involvement of the Checkpoint Regulator VISTA in Suppression of B-Cell but Not T-Cell Responsiveness by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells from Mice Infected with an Immunodeficiency-Causing Retrovirus // *J. Virol.* – 2015. – V. 89. – N. 18. – P. 9693-9698.
87. Gross J.A., Callas E., Allison J.P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse // *J. Immunol.* – 1992. – V. 149. – N. 2. – P. 380-388.
88. Guery T., Roumier C., Berthon C., Renneville A., Preudhomme C., Quesnel B. B7-H3 protein expression in acute myeloid leukemia // *Cancer Med.* – 2015. – V. 4. – N. 12. – P. 1879-1883.
89. Guo Y., Wu Y., Zhao M., Kong X.P., Liu Y. Mutational analysis and an alternatively spliced product of B7 defines its CD28/CTLA4-binding site on immunoglobulin C-like domain // *J. Exp. Med.* – 1995. – V. 181. – N. 4. – P. 1345-1355.
90. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Elassaiss-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumei P. C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X. N., Kang

- S.P. , Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – V. 369. – N. 2. – P. 134-144.
91. Harly C., Guillaume Y., Nedellec S., Peigné C.M., Mönkkönen H., Mönkkönen J., Li J., Kuball J., Adams E.J., Netzer S., Déchanet-Merville J., Léger A., Herrmann T., Breathnach R., Olive D., Bonneville M., Scotet E. Key implication of CD277/butyrophilin-3. – N. BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset // *Blood* – 2012. – V. 120. – N. 11. – P. 2269-2279.
 92. Harper K., Balzano C., Rouvier E., Mattéi M.G., Luciani M.F., Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence message expression gene structure and chromosomal location // *J. Immunol.* – 1991. – V. 147. – N. 3. – P. 1037-1044.
 93. Hashiguchi M., Kobori H., Ritprajak P., Kamimura Y., Kozono H., Azuma M. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2008. – V. 105. – N. 30. – P. 10495-10500.
 94. Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R.J. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function // *J. Exp. Med.* – 1994. – V. 180. – N. 2. – P. 631-640.
 95. Hattori M., Fujiyama A., Taylor T.D., Watanabe H., Yada T., Park H.S., Toyoda A., Ishii K., Totoki Y., Choi D.K., Groner Y., Soeda E., Ohki M., Takagi T., Sakaki Y., Taudien S., Blechschmidt K., Polley A., Menzel U., Delabar J., Kumpf K., Lehmann R., Patterson D., Reichwald K., Rump A., Schillhabel M., Schudy A., Zimmermann W., Rosenthal A., Kudoh J., Schibuya K., Kawasaki K., Asakawa S., Shintani A., Sasaki T., Nagamine K., Mitsuyama S., Antonarakis S.E., Minoshima S., Shimizu N. , Nordsiek G., Hornischer K., Brant P. , Scharfe M., Schon O., Desario A., Reichelt J., Kauer G., Blocker H., Ramser J., Beck A., Klages S., Hennig S., Riesselmann L., Dagand E., Haaf T., Wehrmeyer S., Borzym K., Gardiner K., Nizetic D., Francis F., Lehrach H.,

- Reinhardt R., Yaspo M.L., consortium C.m.a.s. The DNA sequence of human chromosome 21 // *Nature*. – 2000. – V. 405. – N. 6784. – P. 311-319.
96. He X.H., Liu Y., Xu L.H., Zeng Y.Y. Cloning and identification of two novel splice variants of human PD-L2 // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* – 2004. – V. 36. – N. 4. – P. 284-289.
97. Hebbeler A.M., Cairo C., Cummings J.S., Pauza C.D. Individual Vgamma2-Jgamma1.2+ T cells respond to both isopentenyl pyrophosphate and Daudi cell stimulation: generating tumor effectors with low molecular weight phosphoantigens // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2007. – V. 56. – N. 6. – P. 819-829.
98. Hecht I., Toporik A., Podojil J.R., Vaknin I., Cojocaru G., Oren A., Aizman E., Liang S.C., Leung L., Dicken Y., Novik A., Marbach-Bar N., Elmesmari A., Tange C., Gilmour A., McIntyre D., Kurowska-Stolarska M., McNamee K., Leitner J., Greenwald S., Dassa L., Levine Z., Steinberger P., Williams R.O., Miller S.D., McInnes I.B., Neria E., Rotman G. ILDR2 Is a Novel B7-like Protein That Negatively Regulates T Cell Responses // *J. Immunol.* – 2018. – V. 200. – N. 6. – P. 2025-2037.
99. Heid H.W., Winter S., Bruder G., Keenan T.W., Jarasch E.D. Butyrophilin an apical plasma membrane-associated glycoprotein characteristic of lactating mammary glands of diverse species // *Biochim Biophys Acta* – 1983. – V. 728. – N. 2. – P. 228-238.
100. Henry J., Mather I.H., McDermott M.F., Pontarotti P. B30.2-like domain proteins: update and new insights into a rapidly expanding family of proteins // *Mol Biol Evol* – 1998. – V. 15. – N. 12. – P. 1696-1705.
101. Henry J., Miller M.M., Pontarotti P. Structure and evolution of the extended B7 family // *Immunol Today* – 1999. – V. 20. – N. 6. – P. 285-288.

102. Hu Y., Lv X., Wu Y., Xu J., Wang L., Chen W., Zhang W., Li J., Zhang S., Qiu H. Expression of costimulatory molecule B7-H3 and its prognostic implications in human acute leukemia // *Hematology*. – 2015. – V. 20. – N. 4. – P. 187-195.
103. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 // *Nature*. – 1999. – V. 397. – N. 6716 – P. 263-266.
104. Iida T., Ohno H., Nakaseko C., Sakuma M., Takeda-Ezaki M., Arase H., Kominami E., Fujisawa T., Saito T. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – N. 9. – P. 5062-5068.
105. Ingebrigtsen V.A., Boye K., Nesland J.M., Nesbakken A., Flatmark K., Fodstad Ø. B7-H3 expression in colorectal cancer: associations with clinicopathological parameters and patient outcome // *BMC Cancer*. – 2014. – N. 14. – P. 602.
106. Ioerger T.R., Du C., Linthicum D.S. Conservation of cys-cys trp structural triads and their geometry in the protein domains of immunoglobulin superfamily members // *Mol. Immunol.* – 1999. – V. 36. – N. 6. – P. 373-386.
107. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1 a novel member of the immunoglobulin gene superfamily upon programmed cell death // *EMBO J.* – 1992. – V. 11. – N. 11. – P. 3887-3895.
108. Iwai Y., Hamanishi J., Chamoto K., Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway // *J. Biomed. Sci.* – 2017. – V. 24. – N. 1 – P. 26.
109. Janakiram M., Chinai J.M., Fineberg S., Fiser A., Montagna C., Medavarapu R., Castano E., Jeon H., Ohaegbulam K.C., Zhao R., Zhao A., Almo S.C., Sparano J.A., Zang X. Expression Clinical Significance and Receptor Identification of the Newest B7 Family Member HHLA2 Protein // *Clin. Cancer Res.* – 2015. – V. 21. – N. 10. – P. 2359-2366.

110. Jenkins M.K., Chen C.A., Jung G., Mueller D.L., Schwartz R.H. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody // *J. Immunol.* – 1990. – V. 144. – N. 1. – P. 16-22.
111. Jeon H., Vigdorovich V., Garrett-Thomson S.C., Janakiram M., Ramagopal U.A., Abadi Y.M., Lee J.S., Scandiuizzi L., Ohaegbulam K.C., Chinai J.M., Zhao R., Yao Y., Mao Y., Sparano J.A., Almo S.C., Zang X. Structure and cancer immunotherapy of the B7 family member B7x // *Cell. Rep.* – 2014. – V. 9. – N. 3. – P. 1089-1098.
112. June C.H., Ledbetter J.A., Gillespie M.M., Lindsten T., Thompson C.B. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression // *Mol. Cell. Biol.* – 1987. – V. 7. – N. 12. – P. 4472-4481.
113. June C.H., Ledbetter J.A., Linsley P. S., Thompson C.B. Role of the CD28 receptor in T-cell activation // *Immunol. Today.* – 1990. – V. 11. – N. 6. – P. 211-216.
114. Kaifu T., Escalière B., Gastinel L. N., Vivier E., Baratin M. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2011. – V. 68. – N. 21. – P. 3531-3539.
115. Kanai T., Totsuka T., Uraushihara K., Makita S., Nakamura T., Koganei K., Fukushima T., Akiba H., Yagita H., Okumura K., Machida U., Iwai H., Azuma M., Chen L., Watanabe M. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – N. 8. – P. 4156-4163.
116. Karandikar N. J., Vanderlugt C.L., Walunas T.L., Miller S.D., Bluestone J.A. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease // *J. Exp. Med.* – 1996. – V. 184. – N. 2. – P. 783-788.

117. Keir M.E., Liang S.C., Guleria I., Latchman Y.E., Qipo A., Albacker L.A., Koulmanda M., Freeman G.J., Sayegh M.H., Sharpe A.H. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203. – N. 4. – P. 883-895.
118. Kim K., Skora A.D., Li Z., Liu Q., Tam A.J., Blosser R.L., Diaz L.A., Papadopoulos N., Kinzler K.W., Vogelstein B., Zhou S. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2014. – V. 111. – N. 32. – P. 11774-11779.
119. Kim Y.J., Han M.K., Broxmeyer H.E. 4-1BB regulates NKG2D costimulation in human cord blood CD8⁺ T cells // *Blood.* – 2008. – V. 111. – N. 3. – P. 1378-1386.
120. Kluger H.M., Zito C.R., Barr M.L., Baine M.K., Chiang V. L., Sznol M., Rimm D.L., Chen L., Jilaveanu L.B. Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites // *Clin. Cancer. Res.* – 2015. – V. 21. – N. 13 – P. 3052-60.
121. Kobori H., Hashiguchi M., Piao J., Kato M., Ritprajak P., Azuma M. Enhancement of effector CD8⁺ T-cell function by tumour-associated B7-H3 and modulation of its counter-receptor triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 at tumour sites // *Immunology.* – 2010. – V. 130. – N. 3. – P. 363-373.
122. Kohrt H.E., Colevas A.D., Houot R., Weiskopf K., Goldstein M.J., Lund P., Mueller A., Sagiv-Barfi I., Marabelle A., Lira R., Troutner E., Richards L., Rajapaska A., Hebb J., Chester C., Waller E., Ostashko A., Weng W.K., Chen L., Czerwinski D., Fu Y.X., Sunwoo J., Levy R. Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab // *J. Clin. Invest.* – 2014. – V. 124. – N. 6. – P. 2668-2682.
123. Koirala P., Roth M.E., Gill J., Chinai J.M., Ewart M.R., Piperdi S., Geller D.S., Hoang B.H., Fatakhova Y.V., Ghorpade M., Zang X., Gorlick R. HHLA2 a

member of the B7 family is expressed in human osteosarcoma and is associated with metastases and worse survival // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. 31154.

124. Konishi J., Yamazaki K., Azuma M., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression // *Clin. Cancer. Res.* – 2004. – V. 10. – N. 15. – P. 5094-5100.
125. Kopf M., Coyle A.J., Schmitz N., Barner M., Oxenius A., Gallimore A., Gutierrez-Ramos J.C., Bachmann M.F. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – N. 1. – P. 53-61.
126. Krambeck A.E., Thompson R.H., Dong H., Lohse C.M., Park E.S., Kuntz S.M., Leibovich B.C., Blute M.L., Cheville J.C., Kwon E.D. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2006. – V. 103. – N. 27. – P. 10391-10396.
127. Kreymborg K., Haak S., Murali R., Wei J., Waitz R., Gasteiger G., Savage P. A., van den Brink M.R., Allison J.P. Ablation of B7-H3 but Not B7-H4 Results in Highly Increased Tumor Burden in a Murine Model of Spontaneous Prostate Cancer // *Cancer. Immunol. Res.* – 2015. – V. 3. – N. 8. – P. 849-854.
128. Kryczek I., Wei S., Zou L., Zhu G., Mottram P., Xu H., Chen L., Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2006a. – V. 177. – N. 1. – P. 40-44.
129. Kryczek I., Zou L., Rodriguez P., Zhu G., Wei S., Mottram P., Brumlik M., Cheng P., Curiel T., Myers L., Lackner A., Alvarez X., Ochoa A., Chen L., Zou W. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma // *J. Exp. Med.* – 2006b. – V. 203. – N. 4. – P. 871-881.

130. Kunzmann V., Bauer E., Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – V. 340. – N. 9. – P. 737-738.
131. Latchman Y., Wood C.R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A.J., Brown J.A., Nunes R., Greenfield E.A., Bourque K., Boussiotis V. A., Carter L.L., Carreno B.M., Malenkovich N. , Nishimura H., Okazaki T., Honjo T., Sharpe A.H., Freeman G.J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation // *Nat. Immunol.* – 2001. – V. 2. – N. 3. – P. 261-268.
132. Le Mercier I., Chen W., Lines J.L., Day M., Li J., Sargent P., Noelle R.J., Wang L. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity // *Cancer. Res.* – 2014. – V. 74. – N. 7. – P. 1933-1944.
133. Le Page C., Marineau A., Bonza P. K., Rahimi K., Cyr L., Labouba I., Madore J., Delvoye N., Mes-Masson A.M., Provencher D.M., Cailhier J.F. BTN3A2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – N. 6. – P. e38541.
134. Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade // *Science* – 1996. – V. 271. – N. 5256. – P. 1734-1736.
135. Leitner J., Klausner C., Pickl W.F., Stöckl J., Majdic O., Bardet A.F., Kreil D.P., Dong C., Yamazaki T., Zlabinger G., Pfistershammer K., Steinberger P. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – V. 39. – N. 7. – P. 1754-1764.
136. Lenschow D.J., Sperling A.I., Cooke M.P., Freeman G., Rhee L., Decker D.C., Gray G., Nadler L.M., Goodnow C.C., Bluestone J.A. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen // *J. Immunol.* – 1994. – V. 153. – N. 5. – P. 1990-1997.

137. Leong S.R., Liang W.C., Wu Y., Crocker L., Cheng E., Sampath D., Ohri R., Raab H., Hass P. E., Pham T., Firestein R., Li D., Schutten M., Stagg N. J., Ogasawara A., Koppada N., Roth L., Williams S.P., Lee B.C., Chalouni C., Peng I., DeVoss J., Tremayne J., Polakis P., Polson A.G. An anti-B7-H4 antibody-drug conjugate for the treatment of breast cancer // *Mol. Pharm.* – 2015. – V. 12. – N. 6. – P. 1717-1729.
138. Li J., Semple K., Suh W.K., Liu C., Chen F., Blazar B.R., Yu X.Z. Roles of CD28 CTLA4 and inducible costimulator in acute graft-versus-host disease in mice // *Biol. Blood Marrow. Transplant.* – 2011. – V. 17. – N. 7. – P. 962-969.
139. Liang L., Sha W.C. The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses // *Curr. Opin. Immunol.* – 2002. – V. 14. – N. 3. – P. 384-390.
140. Lindsten T., Lee K.P., Harris E.S., Petryniak B., Craighead N., Reynolds P. J., Lombard D.B., Freeman G.J., Nadler L.M., Gray G.S. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells // *J. Immunol.* – 1993. – V. 151. – N. 7. – P. 3489-3499.
141. Lines J.L., Pantazi E., Mak J., Sempere L.F., Wang L., O'Connell S., Ceeraz S., Suriawinata A.A., Yan S., Ernstoff M.S., Noelle R. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells // *Cancer. Res.* – 2014. – V. 74. – N. 7. – P. 1924-32.
142. Ling V., Wu P. W., Finnerty H.F., Agostino M.J., Graham J.R., Chen S., Jussiff J.M., Fisk G.J., Miller C.P., Collins M. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28 CTLA4 and ICOS gene cluster: analysis by computational comparative and microarray approaches // *Genomics.* – 2001a. – V. 78. – N. 3. – P. 155-168.
143. Ling V., Wu P. W., Finnerty H.F., Bean K.M., Spaulding V., Fouser L.A., Leonard J.P., Hunter S.E., Zollner R., Thomas J.L., Miyashiro J.S., Jacobs K.A., Collins M. Cutting edge: identification of GL50 a novel B7-like protein that

- functionally binds to ICOS receptor // *J. Immunol.* – 2000. – V. 164. – N. 4. – P. 1653-1657.
144. Ling V., Wu P. W., Miyashiro J.S., Marusic S., Finnerty H.F., Collins M. Differential expression of inducible costimulator-ligand splice variants: lymphoid regulation of mouse GL50-B and human GL50 molecules // *J. Immunol.* – 2001b. – V. 166. – N. 12. – P. 7300-7308.
145. Ling V., Wu P. W., Spaulding V., Kieleczawa J., Luxenberg D., Carreno B.M., Collins M. Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss // *Genomics.* – 2003. – V. 82. – N. 3. – P. 365-377.
146. Linsley P. S., Bradshaw J., Greene J., Peach R., Bennett K.L., Mittler R.S. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement // *Immunity* – 1996. – V. 4. – N. 6. – P. 535-543.
147. Linsley P. S., Bradshaw J., Urnes M., Grosmaire L., Ledbetter J.A. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling // *J. Immunol.* – 1993. – V. 150. – N. 8 Pt1. – P. 3161-3169.
148. Linsley P. S., Brady W., Urnes M., Grosmaire L.S., Damle N.K., Ledbetter J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7 // *J. Exp. Med.* – 1991. – V. 174. – N. 3. – P. 561-569.
149. Linsley P. S., Clark E.A., Ledbetter J.A. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 1990. – V. 87. – N. 13. – P. 5031-5035.
150. Linsley P. S., Greene J.L., Tan P., Bradshaw J., Ledbetter J.A., Anasetti C., Damle N.K. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 176. – N. 6. – P. 1595-1604.

151. Linsley P.S., Peach R., Gladstone P., Bajorath J. Extending the B7 (CD80) gene family // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3. – N. 8. – P. 1341-1343.
152. Linsley P.S., Ledbetter J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen // *Annu. Rev. Immunol.* – 1993. – V. 11. – P. 191-212.
153. Liu H., Tekle C., Chen Y.W., Kristian A., Zhao Y., Zhou M., Liu Z., Ding Y., Wang B., Mælandsmo G.M., Nesland J.M., Fodstad O., Tan M. B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation // *Mol. Cancer Ther.* – 2011. – V. 10. – N. 6. – P. 960-971.
154. Loke P., Allison J.P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2003. – V. 100. – N. 9. – P. 5336-5341.
155. Loo D., Alderson R.F., Chen F.Z., Huang L., Zhang W., Gorlatov S., Burke S., Ciccarone V., Li H., Yang Y., Son T., Chen Y., Easton A. N. , Li J.C., Rillema J.R., Lincea M., Fieger C., Liang T.W., Mather J.P. , Koenig S., Stewart S.J., Johnson S., Bonvini E., Moore P. A. Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – V. 18. – N. 14. – P. 3834-3845.
156. Loos M., Hedderich D.M., Ottenhausen M., Giese N.A., Laschinger M., Esposito I., Kleeff J., Friess H. Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer // *BMC Cancer.* – 2009. – V. 9. – P. 463.
157. Lucas P.J., Negishi I., Nakayama K., Fields L.E., Loh D.Y. Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response // *J. Immunol.* – 1995. – V. 154. – N. 11. – P. 5757-5768.
158. Luo L., Chapoval A.I., Flies D.B., Zhu G., Hirano F., Wang S., Lau J.S., Dong H., Tamada K., Flies A.S., Liu Y., Chen L. B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173. – N. 9. – P. 5445-5450.

159. Luo L., Qiao H., Meng F., Dong X., Zhou B., Jiang H., Kanwar J.R., Krissansen G.W., Sun X. Arsenic trioxide synergizes with B7H3-mediated immunotherapy to eradicate hepatocellular carcinomas // *Int. J. Cancer.* – 2006. – V. 118. – N. 7. – P. 1823-1830.
160. Luo L., Zhu G., Xu H., Yao S., Zhou G., Zhu Y., Tamada K., Huang L., Flies A.D., Broadwater M., Ruff W., van Deursen J.M., Melero I., Zhu Z., Chen L. B7-H3 Promotes Pathogenesis of Autoimmune Disease and Inflammation by Regulating the Activity of Different T Cell Subsets // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – N. 6. – P. e0130126.
161. Lupu C.M., Eisenbach C., Lupu A.D., Kuefner M.A., Hoyler B., Stremmel W., Encke J. Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer // *Oncol. Rep.* – 2007. – V. 18. – N. 3. – P. 745-748.
162. Ma L., Luo L., Qiao H., Dong X., Pan S., Jiang H., Krissansen G.W., Sun X. Complete eradication of hepatocellular carcinomas by combined vasostatin gene therapy and B7H3-mediated immunotherapy // *J. Hepatol.* – 2007. – V. 46. – N. 1. – P. 98-106.
163. Maeda N. , Yoshimura K., Yamamoto S., Kuramasu A., Inoue M., Suzuki N. , Watanabe Y., Maeda Y., Kamei R., Tsunedomi R., Shindo Y., Inui M., Tamada K., Yoshino S., Hazama S., Oka M. Expression of B7-H3 a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells affects against recurrence-free survival in breast cancer patients // *Ann. Surg. Oncol.* – 2014. – V. 21. Suppl 4. – P. S546-S554.
164. Mager D.L., Hunter D.G., Schertzer M., Freeman J.D. Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3) // *Genomics.* – 1999. – V. 59. – N. 3. – P. 255-263.
165. Mages H.W., Hutloff A., Heuck C., Büchner K., Himmelbauer H., Oliveri F., Kroczeck R.A. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and

- identification of B7h as ICOS ligand // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – V. 30. – N. 4. – P. 1040-1047.
166. Malcherek G., Mayr L., Roda-Navarro P., Rhodes D., Miller N., Trowsdale J. The B7 homolog butyrophilin BTN2A1 is a novel ligand for DC-SIGN // *J. Immunol.* – 2007. – V. 179. – N. 6. – P. 3804-3811.
167. Maniar A., Zhang X., Lin W., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., Chapoval A.I. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement // *Blood.* – 2010. – V. 116. – N. 10. – P. 1726-1733.
168. Mao L., Fan T.F., Wu L., Yu G.T., Deng W.W., Chen L., Bu L.L., Ma S.R., Liu B., Bian Y., Kulkarni A.B., Zhang W.F., Sun Z.J. Selective blockade of B7-H3 enhances antitumour immune activity by reducing immature myeloid cells in head and neck squamous cell carcinoma // *J. Cell. Mol. Med.* – 2017. – V. 21. – N. 9. – P. 2199-2210.
169. Martín-Fontecha A., Assarsson E., Carbone E., Kärre K., Ljunggren H.G. Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2) // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162. – N. 10. – P. 5910-5916.
170. Matta J., Baratin M., Chiche L., Forel J.M., Cognet C., Thomas G., Farnarier C., Piperoglou C., Papazian L., Chaussabel D., Ugolini S., Vély F., Vivier E. Induction of B7-H6 a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30 in inflammatory conditions // *Blood.* – 2013. – V. 122. – N. 3. – P. 394-404.
171. Mazanet M.M., Hughes C.C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169. – N. 7. – P. 3581-3588.
172. McAdam A.J., Chang T.T., Lumelsky A.E., Greenfield E.A., Boussiotis V. A., Duke-Cohan J.S., Chernova T., Malenkovich N., Jabs C., Kuchroo V. K., Ling V., Collins M., Sharpe A.H., Freeman G.J. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates

- differentiation of CD4⁺ T cells // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – N. 9. – P. 5035-5040.
173. McAdam A.J., Greenwald R.J., Levin M.A., Chernova T., Malenkovich N., Ling V., Freeman G.J., Sharpe A.H. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching // *Nature.* – 2001. – V. 409. – N. 6816. – P. 102-105.
174. McAdam A.J., Schweitzer A. N., Sharpe A.H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells // *Immunol. Rev.* – 1998. – N. 165 – P. 231-247.
175. McArthur J.G., Raulet D.H. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4 // *J Exp Med* – 1993. – V. 178. – N. 5. – P. 1645-1653.
176. Messal N., Mamessier E., Sylvain A., Celis-Gutierrez J., Thibult M.L., Chetaille B., Firaguay G., Pastor S., Guillaume Y., Wang Q., Hirsch I., Nunès J.A., Olive D. Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells // *Eur. J. Immunol.* – 2011. – V. 41. – N. 12. – P. 3443-3454.
177. Miyatake T., Tringler B., Liu W., Liu S.H., Papkoff J., Enomoto T., Torkko K.C., Dehn D.L., Swisher A., Shroyer K.R. B7-H4 is overexpressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration // *Gynecol. Oncol.* – 2007. – V. 106. – N. 1. – P. 119-127.
178. Moretta A., Pantaleo G., Lopez-Botet M., Moretta L. Involvement of T44 molecules in an antigen-independent pathway of T cell activation. Analysis of the correlations to the T cell antigen-receptor complex // *J. Exp. Med.* – 1985. – V. 162. – N. 3. – P. 823-838.
179. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.* – 1989. – V. 7. – P. 145-73.
180. Muenst S., Soysal S.D., Gao F., Obermann E.C., Oertli D., Gillanders W.E. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes

- is associated with poor prognosis in human breast cancer // *Breast. Cancer Res. Treat.* – 2013. – V. 139. – N. 3. – P. 667-676.
181. Mugler K.C., Singh M., Tringler B., Torkko K.C., Liu W., Papkoff J., Shroyer K.R. B7-h4 expression in a range of breast pathology: correlation with tumor T-cell infiltration // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* – 2007. – V. 15. – N. 4. – P. 363-370.
182. Nagashima O., Harada N., Usui Y., Yamazaki T., Yagita H., Okumura K., Takahashi K., Akiba H. B7-H3 contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181. – N. 6. – P. 4062-4071.
183. Nanji S.A., Hancock W.W., Luo B., Schur C.D., Pawlick R.L., Zhu L.F., Anderson C.C., Shapiro A.M. Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse // *Diabetes.* – 2006. – V. 55. – N. 1. – P. 27-33.
184. Nausch N., Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity // *Oncogene.* – 2008. – V. 27. – N. 45. – P. 5944-5958.
185. Nguyen T., Liu X.K., Zhang Y., Dong C. BTNL2 a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation // *J. Immunol.* – 2006. – V. 176. – N. 12. – P. 7354-7360.
186. Ni L., Dong C. New B7 Family Checkpoints in Human Cancers // *Mol. Cancer Ther.* – 2017. – V. 16. – N. 7. – P. 1203-1211.
187. Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N., Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor // *Immunity.* – 1999. – V. 11. – N. 2. – P. 141-151.
188. Nishimura H., Okazaki T., Tanaka Y., Nakatani K., Hara M., Matsumori A., Sasayama S., Mizoguchi A., Hiai H., Minato N., Honjo T. Autoimmune dilated

- cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice // *Science*. – 2001. – V. 291. – N. 5502. – P. 319-222.
189. Nurieva R.I., Mai X.M., Forbush K., Bevan M.J., Dong C. B7h is required for T cell activation differentiation and effector function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2003. – V. 100. – N. 24. – P. 14163-14168.
190. Ogasawara K., Yoshinaga S.K., Lanier L.L. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169. – N. 7. – P. 3676-3685.
191. Ogg S.L., Komaragiri M.V., Mather I.H. Structural organization and mammary-specific expression of the butyrophilin gene // *Mamm. Genome*. – 1996. – V. 7. – N. 12. – P. 900-905.
192. Orabona C., Grohmann U., Belladonna M.L., Fallarino F., Vacca C., Bianchi R., Bozza S., Volpi C., Salomon B.L., Fioretti M.C., Romani L., Puccetti P. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86 // *Nat. Immunol.* – 2004. – V. 5. – N. 11. – P. 1134-1142.
193. Ozkaynak E., Gao W., Shemmeri N., Wang C., Gutierrez-Ramos J.C., Amaral J., Qin S., Rottman J.B., Coyle A.J., Hancock W.W. Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection // *Nat. Immunol.* – 2001. – V. 2. – N. 7. – P. 591-596.
194. Pandya K.J., Gajra A., Warsi G.M., Argonza-Aviles E., Ericson S.G., Wozniak A.J. Multicenter randomized phase 2 study of zoledronic acid in combination with docetaxel and carboplatin in patients with unresectable stage IIIB or stage IV non-small cell lung cancer // *Lung Cancer*. – 2010. – V. 67. – N. 3. – P. 330-338.
195. Park J.J., Omiya R., Matsumura Y., Sakoda Y., Kuramasu A., Augustine M.M., Yao S., Tsushima F., Narazaki H., Anand S., Liu Y., Strome S.E., Chen L., Tamada K. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and

- maintenance of peripheral T-cell tolerance // *Blood*. – 2010. – V. 116. – N. 8. – P. 1291-1298.
196. Pechhold K., Patterson N. B., Craighead N., Lee K.P., June C.H., Harlan D.M. Inflammatory cytokines IFN-gamma plus TNF-alpha induce regulated expression of CD80 (B7-1) but not CD86 (B7-2) on murine fibroblasts // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – N. 10. – P. 4921-4929.
197. Peedicayil A., Vierkant R.A., Hartmann L.C., Fridley B.L., Fredericksen Z.S., White K.L., Elliott E.A., Phelan C.M., Tsai Y.Y., Berchuck A., Iversen E.S., Couch F.J., Peethamabaran P., Larson M.C., Kalli K.R., Kosel M.L., Shridhar V., Rider D. N. , Liebow M., Cunningham J.M., Schildkraut J.M., Sellers T.A., Goode E.L. Risk of ovarian cancer and inherited variants in relapse-associated genes // *PLoS One*. – 2010. – V. 5. – N. 1. – P. e8884.
198. Peng H.X., Wu W.Q., Yang D.M., Jing R., Li J., Zhou F.L., Jin Y.F., Wang S.Y., Chu Y.M. Role of B7-H4 siRNA in Proliferation Migration and Invasion of LOVO Colorectal Carcinoma Cell Line // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – V. 2015. – P. 326981.
199. Podojil J.R., Hecht I., Chiang M.Y., Vaknin I., Barbiro I., Novik A., Neria E., Rotman G., Miller S.D. ILDR2-Fc Is a Novel Regulator of Immune Homeostasis and Inducer of Antigen-Specific Immune Tolerance // *J. Immunol.* – 2018. – V. 200. – N. 6 – P. 2013-2024.
200. Podojil J.R., Miller S.D. Targeting the B7 family of co-stimulatory molecules: successes and challenges // *BioDrugs*. – 2013. – V. 27. – N. 1. – P. 1-13.
201. Postow M.A., Chesney J., Pavlick A.C., Robert C., Grossmann K., McDermott D., Linette G.P., Meyer N., Giguere J.K., Agarwala S.S., Shaheen M., Ernstoff M.S., Minor D., Salama A.K., Taylor M., Ott P. A., Rollin L.M., Horak C., Gagnier P., Wolchok J.D., Hodi F.S. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – V. 372. – N. 21. – P. 2006-2017.

202. Powles T., Eder J.P., Fine G.D., Braithwaite F.S., Loriot Y., Cruz C., Bellmunt J., Burris H.A., Petrylak D.P., Teng S.L., Shen X., Boyd Z., Hegde P.S., Chen D.S., Vogelzang N.J. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer // *Nature*. – 2014. – V. 515. – N. 7528. – P. 558-562.
203. Prasad D.V., Nguyen T., Li Z., Yang Y., Duong J., Wang Y., Dong C. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173. – N. 4. – P. 2500-2506.
204. Prasad D.V., Richards S., Mai X.M., Dong C. B7S1 a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation // *Immunity*. – 2003. – V. 18. – N. 6. – P. 863-873.
205. Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Baker J., Jeffery L.E., Kaur S., Briggs Z., Hou T.Z., Futter C.E., Anderson G., Walker L.S., Sansom D.M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4 // *Science*. – 2011. – V. 332. – N. 6029. – P. 600-603.
206. Radsak M., Iking-Konert C., Stegmaier S., Andrassy K., Hänsch G.M. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation // *Immunology*. – 2000. – V. 101. – N. 4. – P. 521-530.
207. Rahbar R., Lin A., Ghazarian M., Yau H.L., Paramathas S., Lang P.A., Schildknecht A., Elford A.R., Garcia-Batres C., Martin B., Berman H.K., Leong W.L., McCreedy D.R., Reedijk M., Done S.J., Miller N., Youngson B., Suh W.K., Mak T.W., Ohashi P.S. B7-H4 expression by nonhematopoietic cells in the tumor microenvironment promotes antitumor immunity // *Cancer Immunol. Res.* – 2015. – V. 3. – N. 2. – P. 184-195.
208. Rahbar R., Ohashi P.S. B7-H4 is a positive regulator of antitumor immunity // *Oncoimmunology*. – 2016. – V. 5. – N. 1. – P. e1050575.

209. Reeves R.H., Patch D., Sharpe A.H., Borriello F., Freeman G.J., Edelhoff S., Disteche C. The costimulatory genes Cd80 and Cd86 are linked on mouse chromosome 16 and human chromosome 3 // *Mamm. Genome.* – 1997. – V. 8. – N. 8. – P. 581-582.
210. Rhodes D.A., Reith W., Trowsdale J. Regulation of Immunity by Butyrophilins // *Annu. Rev. Immunol.* – 2016. – V. 34 – P. 151-172.
211. Rhodes D.A., Stammers M., Malcherek G., Beck S., Trowsdale J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex // *Genomics.* – 2001. – V. 71. – N. 3. – P. 351-362.
212. Robenek H., Hofnagel O., Buers I., Lorkowski S., Schnoor M., Robenek M.J., Heid H., Troyer D., Severs N. J. Butyrophilin controls milk fat globule secretion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2006. – V. 103. – N. 27. – P. 10385-10390.
213. Robert C., Ribas A., Wolchok J.D., Hodi F.S., Hamid O., Kefford R., Weber J.S., Joshua A.M., Hwu W.J., Gangadhar T.C., Patnaik A., Dronca R., Zarour H., Joseph R.W., Boasberg P. , Chmielowski B., Mateus C., Postow M.A., Gergich K., Elassaiss-Schaap J., Li X. N. , Iannone R., Ebbinghaus S.W., Kang S.P. , Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial // *Lancet.* – 2014. – V. 384. – N. 9948. – P. 1109-17.
214. Robert C., Schachter J., Long G.V., Arance A., Grob J.J., Mortier L., Daud A., Carlino M.S., McNeil C., Lotem M., Larkin J., Lorigan P., Neyns B., Blank C.U., Hamid O., Mateus C., Shapira-Frommer R., Kosh M., Zhou H., Ibrahim N., Ebbinghaus S., Ribas A., investigators K.-. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – V. 372. – N. 26. – P. 2521-2532.
215. Rosenwald A., Wright G., Leroy K., Yu X., Gaulard P., Gascoyne R.D., Chan W.C., Zhao T., Haioun C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Lynch J.C., Vose J., Armitage J.O., Smeland E.B., Kvaloy S., Holte H., Delabie J., Campo E.,

- Montserrat E., Lopez-Guillermo A., Ott G., Muller-Hermelink H.K., Connors J.M., Braziel R., Grogan T.M., Fisher R.I., Miller T.P., LeBlanc M., Chiorazzi M., Zhao H., Yang L., Powell J., Wilson W.H., Jaffe E.S., Simon R., Klausner R.D., Staudt L.M. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198. – N. 6. – P. 851-862.
216. Roth T.J., Sheinin Y., Lohse C.M., Kuntz S.M., Frigola X., Inman B.A., Krambeck A.E., McKenney M.E., Karnes R.J., Blute M.L., Cheville J.C., Sebo T.J., Kwon E.D. B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – N. 16. – P. 7893-7900.
217. Rottman J.B., Smith T., Tonra J.R., Ganley K., Bloom T., Silva R., Pierce B., Gutierrez-Ramos J.C., Ozkaynak E., Coyle A.J. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE // *Nat. Immunol.* – 2001. – V. 2. – N. 7. – P. 605-611.
218. Salama A.D., Chitnis T., Imitola J., Ansari M.J., Akiba H., Tushima F., Azuma M., Yagita H., Sayegh M.H., Khoury S.J. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198. – N. 1 – P. 71-78.
219. Salceda S., Tang T., Kmet M., Munteanu A., Ghosh M., Macina R., Liu W., Pilkington G., Papkoff J. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation // *Exp. Cell. Res.* – 2005. – V. 306. – N. 1. – P. 128-141.
220. Sandstrom A., Peigné C.M., Léger A., Crooks J.E., Konczak F., Gesnel M.C., Breathnach R., Bonneville M., Scotet E., Adams E.J. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells // *Immunity.* – 2014. – V. 40. – N. 4. – P. 490-500.

221. Sanmamed M.F., Pastor F., Rodriguez A., Perez-Gracia J.L., Rodriguez-Ruiz M.E., Jure-Kunkel M., Melero I. Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137 OX40 GITR CD27 CD28 and ICOS // *Semin. Oncol.* – 2015. – V. 42. – N. 4. – P. 640-655.
222. Sarma S., Guo Y., Guilloux Y., Lee C., Bai X.F., Liu Y. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor rejection antigen P1A: normal development but restrained effector function in vivo // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – N. 5. – P. 811-820.
223. Schaerli P., Willimann K., Lang A.B., Lipp M., Loetscher P., Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – N. 11. – P. 1553-1562.
224. Schenk A.D., Gorbacheva V., Rabant M., Fairchild R.L., Valujskikh A. Effector functions of donor-reactive CD8 memory T cells are dependent on ICOS induced during division in cardiac grafts // *Am. J. Transplant.* – 2009. – V. 9. – N. 1. – P. 64-73.
225. Schlecker E., Fiegler N., Arnold A., Altevogt P., Rose-John S., Moldenhauer G., Sucker A., Paschen A., von Strandmann E.P., Textor S., Cerwenka A. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6 the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30 // *Cancer Res.* – 2014. – V. 74. – N. 13. – P. 3429-3440.
226. Schwartz J.C., Zhang X., Nathenson S.G., Almo S.C. Structural mechanisms of costimulation // *Nat. Immunol.* – 2002. – V. 3. – N. 5. – P. 427-434.
227. Schwartz R.H., Mueller D.L., Jenkins M.K., Quill H. T-cell clonal anergy // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 1989. – V. 54 Pt 2. – P. 605-610.
228. Sedy J.R., Gavrieli M., Potter K.G., Hurchla M.A., Lindsley R.C., Hildner K., Scheu S., Pfeffer K., Ware C.F., Murphy T.L., Murphy K.M. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator // *Nat Immunol* – 2005. – V. 6. – N. 1. – P. 90-98.

229. Seidel J.A., Otsuka A., Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action Efficacy and Limitations // *Front. Oncol.* – 2018. – V. 8. – P. 86.
230. Semeraro M., Rusakiewicz S., Minard-Colin V. , Delahaye N. F., Enot D., Vély F., Marabelle A., Papoular B., Piperoglou C., Ponzoni M., Perri P. , Tchirkov A., Matta J., Lapierre V. , Shekarian T., Valsesia-Wittmann S., Commo F., Prada N. , Poirier-Colame V. , Bressac B., Cotteret S., Brugieres L., Farace F., Chaput N. , Kroemer G., Valteau-Couanet D., Zitvogel L. Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – V. 7. – N. 283. – P. 283ra55.
231. Sharma A., Subudhi S.K., Blando J., Scutti J., Vence L., Wargo J., Allison J.P., Ribas A., Sharma P. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3 // *Clin. Cancer Res.* – 2019. – V. 25. – N. 4 – P. 1233-1238.
232. Sharpe A.H. Mechanisms of costimulation // *Immunol. Rev.* – 2009. – V. 229. – N. 1. – P. 5-11.
233. Shi M., Roemer M.G., Chapuy B., Liao X., Sun H., Pinkus G.S., Shipp M.A., Freeman G.J., Rodig S.J. Expression of programmed cell death 1 ligand 2. – N. PD-L2) is a distinguishing feature of primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma and associated with PDCD1LG2 copy gain // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2014. – V. 38. – N. 12. – P. 1715-1723.
234. Shin T., Yoshimura K., Crafton E.B., Tsuchiya H., Housseau F., Koseki H., Schulick R.D., Chen L., Pardoll D.M. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201. – N. 10. – P. 1531-1541.
235. Sica G.L., Choi I.H., Zhu G., Tamada K., Wang S.D., Tamura H., Chapoval A.I., Flies D.B., Bajorath J., Chen L. B7-H4 a molecule of the B7 family negatively regulates T cell immunity // *Immunity.* – 2003. – V. 18. – N. 6. – P. 849-861.

236. Simone R., Barbarat B., Rabellino A., Icardi G., Bagnasco M., Pesce G., Olive D., Saverino D. Ligation of the BT3 molecules members of the B7 family enhance the proinflammatory responses of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells // *Mol. Immunol.* – 2010. – V. 48. – N. 1-3. – P. 109-118.
237. Smith I.A., Knezevic B.R., Ammann J.U., Rhodes D.A., Aw D., Palmer D.B., Mather I.H., Trowsdale J. BTN1A1 the mammary gland butyrophilin and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation // *J. Immunol.* – 2010. – V. 184. – N. 7. – P. 3514-3525.
238. Smith J.B., Lanitis E., Dangaj D., Buza E., Poussin M., Stashwick C., Scholler N., Powell D.J. Tumor Regression and Delayed Onset Toxicity Following B7-H4 CAR T Cell Therapy // *Mol. Ther.* – 2016. – V. 24. – N. 11. – P. 1987-1999.
239. Song H., Park G., Kim Y.S., Hur I., Kim H., Ryu J.W., Lee H.K., Cho D.H., Choi I.H., Lee W.J., Hur D.Y. B7-H4 reverse signaling induces the apoptosis of EBV-transformed B cells through Fas ligand up-regulation // *Cancer Lett.* – 2008. – V. 266. – N. 2. – P. 227-237.
240. Stefferl A., Schubart A., Storch M., Amini A., Mather I., Lassmann H., Linington C. Butyrophilin a milk protein modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – N. 5. – P. 2859-2865.
241. Steinberger P., Majdic O., Derdak S.V., Pfistershammer K., Kirchberger S., Klauser C., Zlabinger G., Pickl W.F., Stöckl J., Knapp W. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3 a member of the B7 family with four Ig-like domains // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172. – N. 4. – P. 2352-2359.
242. Subudhi S.K., Zhou P., Yerian L.M., Chin R.K., Lo J.C., Anders R.A., Sun Y., Chen L., Wang Y., Alegre M.L., Fu Y.X. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 113. – N. 5. – P. 694-700.

243. Suh W.K., Gajewska B.U., Okada H., Gronski M.A., Bertram E.M., Dawicki W., Duncan G.S., Bukczynski J., Plyte S., Elia A., Wakeham A., Itie A., Chung S., Da Costa J., Arya S., Horan T., Campbell P., Gaida K., Ohashi P. S., Watts T.H., Yoshinaga S.K., Bray M.R., Jordana M., Mak T.W. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4. – N. 9. – P. 899-906.
244. Suh W.K., Tafuri A., Berg-Brown N. N., Shahinian A., Plyte S., Duncan G.S., Okada H., Wakeham A., Odermatt B., Ohashi P.S., Mak T.W. The inducible costimulator plays the major costimulatory role in humoral immune responses in the absence of CD28 // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172. – N. 10. – P. 5917-5923.
245. Suh W.K., Wang S., Duncan G.S., Miyazaki Y., Cates E., Walker T., Gajewska B.U., Deenick E., Dawicki W., Okada H., Wakeham A., Itie A., Watts T.H., Ohashi P. S., Jordana M., Yoshida H., Mak T.W. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7x-deficient mice // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V. 26. – N. 17. – P. 6403-6411.
246. Sullivan B.A., Tsuji W., Kivitz A., Peng J., Arnold G.E., Boedigheimer M.J., Chiu K., Green C.L., Kaliyaperumal A., Wang C., Ferbas J., Chung J.B. Inducible T-cell co-stimulator ligand (ICOSL) blockade leads to selective inhibition of anti-KLH IgG responses in subjects with systemic lupus erythematosus // *Lupus Sci. Med.* – 2016. – V. 3. – N. 1. – P. e000146.
247. Sun J., Chen L.J., Zhang G.B., Jiang J.T., Zhu M., Tan Y., Wang H.T., Lu B.F., Zhang X.G. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2010. – V. 59. – N. 8. – P. 1163-1171.
248. Sun J., Fu F., Gu W., Yan R., Zhang G., Shen Z., Zhou Y., Wang H., Shen B., Zhang X. Origination of new immunological functions in the costimulatory molecule B7-H3: the role of exon duplication in evolution of the immune system // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – N. 9. – P. e24751.

249. Sun J., Guo Y.D., Li X. N., Zhang Y.Q., Gu L., Wu P.P., Bai G.H., Xiao Y. B7-H3 expression in breast cancer and upregulation of VEGF through gene silence // *Onco. Targets Ther.* – 2014. – V. 7. – P. 1979-1986.
250. Sun J., Liu C., Gao L., Guo Y., Zhang Y., Wu P., Jiang J., Yan R., Zhang X. Correlation between B7-H3 expression and rheumatoid arthritis: A new polymorphism haplotype is associated with increased disease risk // *Clin. Immunol.* – 2015. – V. 159. – N. 1. – P. 23-32.
251. Sun M., Richards S., Prasad D.V., Mai X.M., Rudensky A., Dong C. Characterization of mouse and human B7-H3 genes // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168. – N. 12 – P. 6294-7.
252. Sun X., Vale M., Leung E., Kanwar J.R., Gupta R., Krissansen G.W. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity // *Gene Ther.* – 2003. – V. 10. – N. 20. – P. 1728-1734.
253. Sun Y., Wang Y., Zhao J., Gu M., Giscombe R., Lefvert A.K., Wang X. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer // *Lung Cancer.* – 2006. – V. 53. – N. 2. – P. 143-151.
254. Swallow M.M., Wallin J.J., Sha W.C. B7h a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2 is induced by TNFalpha // *Immunity.* – 1999. – V. 11. – N. 4. – P. 423-432.
255. Swanson R.M., Gavin M.A., Escobar S.S., Rottman J.B., Lipsky B.P., Dube S., Li L., Bigler J., Wolfson M., Arnett H.A., Viney J.L. Butyrophilin-like 2 modulates B7 costimulation to induce Foxp3 expression and regulatory T cell development in mature T cells // *J. Immunol.* – 2013. – V. 190. – N. 5. – P. 2027-2035.
256. Symington F.W., Brady W., Linsley P.S. Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells // *J. Immunol.* – 1993. – V. 150. – N. 4. – P. 1286-1295.

257. Tafuri A., Shahinian A., Blatt F., Yoshinaga S.K., Jordana M., Wakeham A., Boucher L.M., Bouchard D., Chan V. S., Duncan G., Odermatt B., Ho A., Itie A., Horan T., Whoriskey J.S., Pawson T., Penninger J.M., Ohashi P. S., Mak T.W. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses // *Nature*. – 2001. – V. 409. – N. 6816. – P. 105-109.
258. Tang F., Du X., Liu M., Zheng P., Liu Y. Anti-CTLA-4 antibodies in cancer immunotherapy: selective depletion of intratumoral regulatory T cells or checkpoint blockade? // *Cell Biosci*. – 2018. – V. 8. – P. 30.
259. Taube J.M., Anders R.A., Young G.D., Xu H., Sharma R., McMiller T.L., Chen S., Klein A.P., Pardoll D.M., Topalian S.L., Chen L. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape // *Sci. Transl. Med*. – 2012. – V. 4. – N. 127. – P. 127ra37.
260. Taylor R.J., Chan S.L., Wood A., Voskens C.J., Wolf J.S., Lin W., Chapoval A., Schulze D.H., Tian G., Strome S.E. FcγRIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck // *Cancer Immunol. Immunother*. – 2009. – V. 58. – N. 7. – P. 997-1006.
261. Tezuka K., Tsuji T., Hirano D., Tamatani T., Sakamaki K., Kobayashi Y., Kamada M. Identification and characterization of rat AILIM/ICOS a novel T-cell costimulatory molecule related to the CD28/CTLA4 family // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2000. – V. 276. – N. 1. – P. 335-345.
262. Thompson C.B., Lindsten T., Ledbetter J.A., Kunkel S.L., Young H.A., Emerson S.G., Leiden J.M., June C.H. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 1989. – V. 86. – N. 4. – P. 1333-1337.
263. Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A. N., Lynch W.P., Bluestone J.A., Sharpe A.H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan

- tissue destruction revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* – 1995. – V. 3. – N. 5. – P. 541-547.
264. Tokito T., Azuma K., Kawahara A., Ishii H., Yamada K., Matsuo N., Kinoshita T., Mizukami N., Ono H., Kage M., Hoshino T. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8⁺ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy // *Eur J Cancer* – 2016. – V. 55. – P. 7-14.
265. Topalian S.L., Sznol M., McDermott D.F., Kluger H.M., Carvajal R.D., Sharfman W.H., Brahmer J.R., Lawrence D.P., Atkins M.B., Powderly J.D., Leming P. D., Lipson E.J., Puzanov I., Smith D.C., Taube J.M., Wigginton J.M., Kollia G.D., Gupta A., Pardoll D.M., Sosman J.A., Hodi F.S. Survival durable tumor remission and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – V. 32. – N. 10. – P. 1020-1030.
266. Tseng S.Y., Otsuji M., Gorski K., Huang X., Slansky J.E., Pai S.I., Shalabi A., Shin T., Pardoll D.M., Tsuchiya H. B7-DC a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 193. – N. 7. – P. 839-846.
267. Tsushima F., Iwai H., Otsuki N., Abe M., Hirose S., Yamazaki T., Akiba H., Yagita H., Takahashi Y., Omura K., Okumura K., Azuma M. Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – V. 33. – N. 10. – P. 2773-2782.
268. Turka L.A., Ledbetter J.A., Lee K., June C.H., Thompson C.B. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3⁺ mature thymocytes // *J. Immunol.* – 1990. – V. 144. – N. 5. – P. 1646-1653.
269. Valentonyte R., Hampe J., Huse K., Rosenstiel P., Albrecht M., Stenzel A., Nagy M., Gaede K.I., Franke A., Haesler R., Koch A., Lengauer T., Seegert D., Reiling N., Ehlers S., Schwinger E., Platzer M., Krawczak M., Müller-

- Quernheim J., Schürmann M., Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2 // *Nat. Genet.* – 2005. – V. 37. – N. 4. – P. 357-364.
270. Valk E., Leung R., Kang H., Kaneko K., Rudd C.E., Schneider H. T cell receptor-interacting molecule acts as a chaperone to modulate surface expression of the CTLA-4 coreceptor // *Immunity.* – 2006. – V. 25. – N. 5. – P. 807-821.
271. Via C.S., Rus V., Nguyen P., Linsley P., Gause W.C. Differential effect of CTLA4Ig on murine graft-versus-host disease (GVHD) development: CTLA4Ig prevents both acute and chronic GVHD development but reverses only chronic GVHD // *J. Immunol.* – 1996. – V. 157. – N. 9. – P. 4258-4267.
272. Vigdorovich V., Ramagopal U.A., Lázár-Molnár E., Sylvestre E., Lee J.S., Hofmeyer K.A., Zang X., Nathenson S.G., Almo S.C. Structure and T cell inhibition properties of B7 family member B7-H3 // *Structure* – 2013. – V. 21. – N. 5. – P. 707-717.
273. Viola A., Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds // *Science.* – 1996. – V. 273. – N. 5271. – P. 104-106.
274. Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells // *Nat. Immunol.* – 2008. – V. 9. – N. 5. – P. 503-510.
275. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P. S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation // *Immunity.* – 1994. – V. 1. – N. 5. – P. 405-413.
276. Wang H., Henry O., Distefano M.D., Wang Y.C., Räikkönen J., Mönkkönen J., Tanaka Y., Morita C.T. Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells // *J. Immunol.* – 2013a. – V. 191. – N. 3. – P. 1029-1042.
277. Wang J., Chong K.K., Nakamura Y., Nguyen L., Huang S.K., Kuo C., Zhang W., Yu H., Morton D.L., Hoon D.S. B7-H3 associated with tumor progression

- and epigenetic regulatory activity in cutaneous melanoma // *J. Invest. Dermatol.* – 2013b. – V. 133. – N. 8. – P. 2050-2058.
278. Wang J., Yoshida T., Nakaki F., Hiai H., Okazaki T., Honjo T. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2005a. – V. 102. – N. 33. – P. 11823-11828.
279. Wang L., Cao N. N., Wang S., Man H.W., Li P.F., Shan B.E. Roles of coinhibitory molecules B7-H3 and B7-H4 in esophageal squamous cell carcinoma // *Tumour Biol.* – 2016. – V. 37. – N. 3. – P. 2961-2971
280. Wang L., Fraser C.C., Kikly K., Wells A.D., Han R., Coyle A.J., Chen L., Hancock W.W. B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection // *Eur. J. Immunol.* – 2005b. – V. 35. – N. 2. – P. 428-438.
281. Wang L., Rubinstein R., Lines J.L., Wasiuk A., Ahonen C., Guo Y., Lu L.F., Gondek D., Wang Y., Fava R.A., Fiser A., Almo S., Noelle R.J. VISTA a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses // *J. Exp. Med.* – 2011. – V. 208. – N. 3. – P. 577-592.
282. Wang S., Bajorath J., Flies D.B., Dong H., Honjo T., Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 197. – N. 9. – P. 1083-1091.
283. Wang S., Zhu G., Chapoval A.I., Dong H., Tamada K., Ni J., Chen L. Costimulation of T cells by B7-H2 a B7-like molecule that binds ICOS // *Blood.* – 2000. – V. 96. – N. 8. – P. 2808-2813.
284. Watanabe N., Gavrieli M., Sedy J.R., Yang J., Fallarino F., Loftin S.K., Hurchla M.A., Zimmerman N., Sim J., Zang X., Murphy T.L., Russell J.H., Allison J.P., Murphy K.M. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1 // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4. – N. 7. – P. 670-679.
285. Waterhouse P., Penninger J.M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K.P., Thompson C.B., Griesser H., Mak T.W. Lymphoproliferative disorders

- with early lethality in mice deficient in Ctl4 // *Science*. – 1995. – V. 270. – N. 5238. – P. 985-988.
286. Wilhelm M., Kunzmann V., Eckstein S., Reimer P., Weissinger F., Ruediger T., Tony H.P. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies // *Blood*. – 2003. – V. 102. – N. 1. – P. 200-206.
287. Wilson J.L., Charo J., Martín-Fontecha A., Dellabona P., Casorati G., Chambers B.J., Kiessling R., Bejarano M.T., Ljunggren H.G. NK cell triggering by the human costimulatory molecules CD80 and CD86 // *J. Immunol.* – 1999. – V. 163. – N. 8. – P. 4207-4212.
288. Wolchok J.D., Kluger H., Callahan M.K., Postow M.A., Rizvi N. A., Lesokhin A.M., Segal N. H., Ariyan C.E., Gordon R.A., Reed K., Burke M.M., Caldwell A., Kronenberg S.A., Agunwamba B.U., Zhang X., Lowy I., Inzunza H.D., Feely W., Horak C.E., Hong Q., Korman A.J., Wigginton J.M., Gupta A., Sznol M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – V. 369. – N. 2. – P. 122-133.
289. Wong S.C., Oh E., Ng C.H., Lam K.P. Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2 // *Blood*. – 2003. – V. 102. – N. 4. – P. 1381-1388.
290. Wu C.P., Jiang J.T., Tan M., Zhu Y.B., Ji M., Xu K.F., Zhao J.M., Zhang G.B., Zhang X.G. Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12. – N. 3 – P. 457-459.
291. Xu H., Cheung I.Y., Guo H.F., Cheung N. K. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – N. 15. – P. 6275-6281.

292. Xu Y.H., Zhang G.B., Wang J.M., Hu H.C. B7-H3 and CD133 expression in non-small cell lung cancer and correlation with clinicopathologic factors and prognosis // *Saudi Med. J.* – 2010. – V. 31. – N. 9. – P. 980-986.
293. Yamashiro H., Yoshizaki S., Tadaki T., Egawa K., Seo N. Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity // *J. Leukoc. Biol.* – 2010. – V. 88. – N. 4. – P. 757-767.
294. Yamato I., Sho M., Nomi T., Akahori T., Shimada K., Hotta K., Kanehiro H., Konishi N., Yagita H., Nakajima Y. Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer // *Br. J. Cancer.* – 2009. – V. 101. – N. 10. – P. 1709-1716.
295. Yamazaki T., Akiba H., Iwai H., Matsuda H., Aoki M., Tanno Y., Shin T., Tsuchiya H., Pardoll D.M., Okumura K., Azuma M., Yagita H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169. – N. 10. – P. 5538-5545.
296. Yamazaki T., Goya I., Graf D., Craig S., Martin-Orozco N., Dong C. A butyrophilin family member critically inhibits T cell activation // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185. – N. 10. – P. 5907-5914.
297. Yan R., Yang S., Gu A., Zhan F., He C., Qin C., Zhang X., Feng P. Murine b7-h3 is a co-stimulatory molecule for T cell activation // *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* – 2013. – V. 32. – N. 6. – P. 395-398.
298. Yang H.Y., Chu M., Zheng L.W., Zwahlen R.A., Luo J., Zou D.H., Sun S.T. Transgenic B7-H3 therapy induces tumor-specific immune response in human oral squamous cell cancer: an in vitro study // *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* – 2008. – V. 106. – N. 5. – P. 721-728.
299. Yang Y., Liu X.K., Nguyen T., Bishop C., Graf D., Dong C. Characterization of B7S3 as a novel negative regulator of T cells // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – N. 6. – P. 3661-3667.

300. Yao Y., Wang X., Jin K., Zhu J., Wang Y., Xiong S., Mao Y., Zhou L. B7-H4 is preferentially expressed in non-dividing brain tumor cells and in a subset of brain tumor stem-like cells // *J. Neurooncol.* – 2008. – V. 89. – N. 2. – P. 121-129.
301. Yi T., Li X., Yao S., Wang L., Chen Y., Zhao D., Johnston H.F., Young J.S., Liu H., Todorov I., Forman S.J., Chen L., Zeng D. Host APCs augment in vivo expansion of donor natural regulatory T cells via B7H1/B7.1 in allogeneic recipients // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186. – N. 5. – P. 2739-2749.
302. Yoshinaga S.K., Whoriskey J.S., Khare S.D., Sarmiento U., Guo J., Horan T., Shih G., Zhang M., Coccia M.A., Kohno T., Tafuri-Bladt A., Brankow D., Campbell P., Chang D., Chiu L., Dai T., Duncan G., Elliott G.S., Hui A., McCabe S.M., Scully S., Shahinian A., Shaklee C.L., Van G., Mak T.W., Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS // *Nature.* – 1999. – V. 402. – N. 6763. – P. 827-832.
303. Zang X., Loke P., Kim J., Murphy K., Waitz R., Allison J.P. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2003. – V. 100. – N. 18. – P. 10388-10392.
304. Zang X., Sullivan P.S., Soslow R.A., Waitz R., Reuter V. E., Wilton A., Thaler H.T., Arul M., Slovin S.F., Wei J., Spriggs D.R., Dupont J., Allison J.P. Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas // *Mod. Pathol.* – 2010. – V. 23. – N. 8. – P. 1104-1112.
305. Zang X., Thompson R.H., Al-Ahmadie H.A., Serio A.M., Reuter V. E., Eastham J.A., Scardino P. T., Sharma P., Allison J.P. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2007. – V. 104. – N. 49. – P. 19458-19463.
306. Zhang G.B., Chen Y.J., Shi Q., Ma H.B., Ge Y., Wang Q., Jiang Z., Xu Y., Zhang X.G. Human recombinant B7-H3 expressed in E.coli enhances T

- lymphocyte proliferation and IL-10 secretion in vitro // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* – 2004. – V. 36. – N. 6. – P. 430-436.
307. Zhang G., Wang J., Kelly J., Gu G., Hou J., Zhou Y., Redmond H.P., Wang J.H., Zhang X. B7-H3 augments the inflammatory response and is associated with human sepsis // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185. – N. 6. – P. 3677-3684.
308. Zhang L., Wu H., Lu D., Li G., Sun C., Song H., Li J., Zhai T., Huang L., Hou C., Wang W., Zhou B., Chen S., Lu B., Zhang X. The costimulatory molecule B7-H4 promote tumor progression and cell proliferation through translocating into nucleus // *Oncogene* – 2013. – V. 32. – N. 46. – P. 5347-5358.
309. Zhang P., Yu S., Li H., Liu C., Li J., Lin W., Gao A., Wang L., Gao W., Sun Y. ILT4 drives B7-H3 expression via PI3K/AKT/mTOR signaling and ILT4/B7-H3 co-expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer // *FEBS Lett.* – 2015a. – V. 589. – N. 17. – P. 2248-2256.
310. Zhang T., Jiang B., Zou S.T., Liu F., Hua D. Overexpression of B7-H3 augments anti-apoptosis of colorectal cancer cells by Jak2-STAT3 // *World J. Gastroenterol.* – 2015b. – V. 21. – N. 6. – P. 1804-1813.
311. Zhang T., Wu M.R., Sentman C.L. An NKp30-based chimeric antigen receptor promotes T cell effector functions and antitumor efficacy in vivo // *J. Immunol.* – 2012. – V. 189. – N. 5. – P. 2290-2299.
312. Zhang W., Wang Y., Wang J., Dong F., Zhu M., Wan W., Li H., Wu F., Yan X., Ke X. B7-H3 silencing inhibits tumor progression of mantle cell lymphoma and enhances chemosensitivity // *Int. J. Oncol.* – 2015c. – V. 46. – N. 6. – P. 2562-2572.
313. Zhao R., Chinai J.M., Buhl S., Scandiuzzi L., Ray A., Jeon H., Ohaegbulam K.C., Ghosh K., Zhao A., Scharff M.D., Zang X. HHLA2 is a member of the B7 family and inhibits human CD4 and CD8 T-cell function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2013. – V. 110. – N. 24. – P. 9879-9884.

314. Zhou X., Kubo M., Nishitsuji H., Kurihara K., Ikeda T., Ohashi T., Azuma M., Masuda T., Kannagi M. Inducible-costimulator-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4(+) T lymphocytes // *Virology*. – 2004. – V. 325. – N. 2. – P. 252-263.
315. Zhou Z.H., Ji C.D., Zhu J., Xiao H.L., Zhao H.B., Cui Y.H., Bian X.W. The prognostic value and pathobiological significance of Glasgow microenvironment score in gastric cancer // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2017. – V. 143. – N. 5. – P. 883-894.
316. Zhou Z., Luther N., Ibrahim G.M., Hawkins C., Vibhakar R., Handler M.H., Souweidane M.M. B7-H3 a potential therapeutic target is expressed in diffuse intrinsic pontine glioma // *J. Neurooncol.* – 2013. – V. 111. – N. 3. – P. 257-264.
317. Zhu G., Augustine M.M., Azuma T., Luo L., Yao S., Anand S., Rietz A.C., Huang J., Xu H., Flies A.S., Flies S.J., Tamada K., Colonna M., van Deursen J.M., Chen L. B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity // *Blood*. – 2009. – V. 113. – N. 8. – P. 1759-1767.
318. Zhu Y., Yao S., Iliopoulou B.P., Han X., Augustine M.M., Xu H., Phennicie R.T., Flies S.J., Broadwater M., Ruff W., Taube J.M., Zheng L., Luo L., Zhu G., Chen J., Chen L. B7-H5 costimulates human T cells via CD28H // *Nat Commun* – 2013. – V. 4 – P. 2043.
319. Zou W., Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8. – N. 6. – P. 467-477.