

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Беловежец Татьяна Николаевна

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ CAR T- И CAR NK-КЛЕТОК В
ДОКЛИНИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ В-КЛЕТОЧНЫХ
ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА**

1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Горчаков Андрей Александрович

Новосибирск, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность темы исследования	7
Степень разработанности проблемы	8
Цель и задачи исследования.....	8
Научная новизна и практическая ценность исследований.....	9
Методология и методы исследования	10
Положения, выносимые на защиту	11
Степень достоверности результатов	11
Публикации по теме диссертации	11
Тезисы конференций.....	12
Апробация работы.....	12
Вклад автора	13
Структура диссертации.....	13
Благодарности.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Онкологические заболевания В-клеточной природы	14
1.2. Терапия при помощи CAR Т-клеток	16
1.2.1. CAR Т-клеточная терапия в контексте В-клеточных неоплазий.....	18
1.2.2. Сравнение терапии CAR Т-клетками с терапией моноклональными антителами	20
1.3. CD20 как мишень CAR Т-клеточной терапии.....	22
1.3.1. Строение и функции CD20	22
1.3.2. CD20-CAR в клинических испытаниях.....	23
1.4. Структура и состав CAR.....	25
1.4.1. Антигенраспознающий домен CAR	26
1.4.2. Шарнирный домен CAR	32
1.4.3. Трансмембранный домен CAR	34
1.4.4. Сигнальный домен CAR	34
1.4.5. Дополнительные последовательности в CAR-кассете	36
1.5. Субпопуляционный состав CAR Т-клеточных продуктов.....	38
1.6. Использование NK-клеток и NK-клеточных линий в качестве носителей для CAR	40
1.7. Заключение: проблемы и перспективы развития CAR-платформы.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ	46
2.1. Материалы	46
2.1.1. Реактивы и препараты.....	46
2.1.2. Оборудование и программное обеспечение	47
2.1.3. Буферы и растворы.....	48
2.1.4. Олигонуклеотиды и плазмидные конструкции.....	48
2.1.5. Биологические материалы.....	49
2.1.6. Питательные среды для выращивания <i>E. coli</i>	49
2.2 Методы	50

2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	50
2.2.2 Электрофорез в агарозном геле	50
2.2.3 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции	50
2.2.4. Выделение ДНК из агарозного геля	50
2.2.5. Лигирование ДНК	51
2.2.6. Электротрансформация клеток <i>E. coli</i>	51
2.2.6.1. Приготовление электрокомпетентных клеток <i>E. coli</i>	51
2.2.6.2. Электротрансформация плазмидной ДНК в электрокомпетентные клетки <i>E. coli</i>	51
2.2.7. Выделение плазмидной ДНК	51
2.2.8. Переосаждение ДНК	52
2.2.9. Техники посева клеток <i>E. coli</i> на агаризованную среду	52
2.2.10. Сиквенсная реакция	52
2.2.11. Культивирование клеточных линий человека	53
2.2.12 Криоконсервация клеточных линий	53
2.2.13. Разморозка клеточных линий	54
2.2.14. Получение целевых линий клеток при помощи клеточной сортировки	54
2.2.15. Сборка вирусных частиц, псевдотипированных VSV-G, и определение титра	55
2.2.16. Выделение первичных Т-клеток от здорового донора	55
2.2.17 Активация Т-клеток	56
2.2.18. Трансдукция первичных Т-клеток человека	56
2.2.19. Проточная цитофлуориметрия (FACS)	56
2.2.20. Активационный тест	57
2.2.21. Тест на моментальную цитотоксичность	57
2.2.21.1. Мечение клеток	57
2.2.21.2. Цитотоксический тест	57
2.2.22. Тест на повторяющуюся цитотоксичность	58
2.2.23. Анализ субпопуляционного состава CAR Т-клеточных продуктов	58
2.2.24. Анализ экспрессии маркеров Т-клеточного истощения среди CAR Т-клеточных продуктов после длительной стимуляции антигеном	59
2.2.25. Определение уровня секреции провоспалительных цитокинов IL2 и IFN γ после коинкубации CAR Т-клеток с клетками-мишенями при помощи иммуноферментного анализа	59
2.2.26. Определение интенсивности люминесценции клеток <i>in vitro</i>	59
2.2.27. Методы работы с животными	60
2.2.28. Визуализация опухолевой нагрузки с использованием системы прижизненной визуализации «IVIS Spectrum»	60
2.2.29. Статистическая обработка данных	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1 Получение конструкций для создания CD20-специфичных CAR с различными антигенраспознающими районами	62
3.2. Характеризация полученных CAR Т-клеток в тестах <i>in vitro</i>	63
3.2.1. Анализ поверхностной экспрессии CAR в контексте Т-клеток здоровых доноров	63

3.2.2. Фенотипический анализ полученных CAR T-клеточных продуктов	64
3.2.3. CD20-специфичные CAR T-клетки обеспечивают сравнимый уровень специфической активации	69
3.2.4. CD20-специфичные CAR T-клетки перенаправляют цитотоксичность первичных T-клеток здорового донора.....	71
3.3. Характеризация активности полученных CAR T-клеток на модели ксенотрансплантированной опухоли в эксперименте <i>in vivo</i>	74
3.4. Создание В-клеточной линии Nalm6-Nluc-sopGFP для прижизненной визуализации опухолевой нагрузки и ответа на терапию	77
3.5. Создание и характеризация <i>in vitro</i> CAR, специфичных одновременно к CD19 и CD20 ..	82
3.6. Выбор альтернативного клеточного носителя для CAR терапии	87
3.6.1. Получение CD20-специфических CAR NK-клеточных линий и анализ уровня поверхностной экспрессии рецептора.....	88
3.6.2. Полученные CD20-специфические CAR NK-клеточные линии функциональны в тестах <i>in vitro</i>	89
3.6.3. Полученные CD20-специфические CAR NK-клеточные линии достоверно увеличивают продолжительность жизни мышей линии <i>NOD/Scid</i> с ксенотрансплантированной опухолью	90
3.7. Возможности для получения “усиленных” CAR клеток.....	92
3.8. Заключение	95
ГЛАВА 4. ВЫВОДЫ	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	97
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	134

Список сокращений

7AAD	–	7-аминоактиномицин D
ADCC	–	антителозависимая клеточная цитотоксичность
APC	–	аллофикоцианин
B-ALL	–	B-клеточный острый лимфобластный лейкоз
BCMA	–	B-клеточный антиген созревания
BiTE	–	биспецифический активатор T-клеток
CAR	–	химерный антигенный рецептор
CDC	–	комплементзависимая цитотоксичность
CLL	–	хронический лимфолейкоз
CR	–	полный ответ на терапию
DARPin	–	искусственный белок с анкириновыми повторами
DLBCL	–	диффузная крупноклеточная B-клеточная лимфома
DTT	–	дитиотреитол
dNTP	–	дезоксинуклеозидтрифосфаты
EDTA	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
FACS	–	проточная цитофлуориметрия
FCS/FBS	–	фетальная телячья сыворотка
FcγR	–	Fcγ рецептор
FITC	–	флуоресцеин-5-изотиоцианат
FL	–	фолликулярная лимфома
HLA	–	человеческий лейкоцитарный антиген
HBS	–	буферно-солевой раствор на основе HEPES
HEPES	–	4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота
iPSC	–	индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
Ig	–	иммуноглобулин
ITAM	–	тирозинсодержащий активационный мотив
LB	–	лизогенная среда
MHC	–	главный фактор гистосовместимости
MM	–	множественная миелома
MOI	–	множественность инфекции
MR	–	минимальный ответ на терапию
NaN ₃	–	азид натрия
NaOAc	–	ацетат натрия

NHL	–	неходжкинская лимфома
NK	–	натуральный киллер
ORR	–	общая частота ответа на терапию
PBL	–	лейкоциты периферической крови
PBS	–	натрий-фосфатный буфер
PE	–	фикоэритрин
PR	–	частичный ответ на терапию
PROTAC	–	химерная молекула для выборочного протеолиза белка
r/r B-ALL	–	резистентный В-клеточный острый лимфобластный лейкоз
scFv	–	одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела
TAE	–	трис-ацетатный электродный буфер
TCR	–	T-клеточный рецептор
а.о.	–	аминокислотный остаток
АТФ	–	аденозинтрифосфат
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
п.н.	–	пара нуклеотидов
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РНКаза	–	рибонуклеаза А
РТПХ	–	реакция “трансплантат против хозяина”

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Уровень пятилетней выживаемости при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ALL) в 80-х годах XX века составлял всего 50%, однако к началу двухтысячных он увеличился до 67%. Это стало возможным благодаря новым достижениям в химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). К сожалению, дальнейший прогресс в этой области замедлился и за период 2010-2017 гг. пятилетняя выживаемость увеличилась только до 72%. Стало очевидно, что потенциал химиотерапии и ТГСК используется почти полностью и следующие шаги в этой области должны опираться на новые технологии, в том числе на клеточную иммунотерапию.

Именно поэтому активное развитие получила CAR Т-клеточная терапия. Данный вид терапии основан в настоящее время на использовании собственных Т-лимфоцитов пациента, генетически модифицированных для экспрессии химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR). Химерный антигенный рецептор – это искусственный трансмембранный белок, внеклеточная часть которого несет функцию распознавания целевого антигена, а внутриклеточная – функцию передачи активирующего Т-клетку сигнала. В качестве антигенраспознающей части CAR, как правило, используют VH и VL домены антител, объединенные гибким линкером (формат scFv), либо иные белки с аффинностью к антигену. Внутриклеточная область CAR чаще всего заимствована от активирующих и ко-стимулирующих молекул, таких как CD3 ζ , CD28, 4-1BB и др. При контакте CAR Т-лимфоцита с опухолевой клеткой антигенраспознающая часть CAR связывается с белком-мишенью на поверхности опухолевой клетки. Этот процесс запускает каскад сигналов от внутриклеточной части CAR и приводит к активации CAR Т-лимфоцита и лизису мишени. Таким образом, CAR объединяет в себе специфичность антител и цитотоксический потенциал Т-клеток, позволяя перенаправить цитотоксичность собственных Т-клеток пациента на новые мишени.

Внедрение CAR Т-клеточной терапии позволило предоставить дополнительные опции для пациентов с рецидивирующими и резистентными формами В-ALL, а также с агрессивными формами В-клеточных лимфом, которые до этого имели очень низкие шансы на выживание. В то же время, уже накопленные данные проведенных клинических испытаний показали, что часть пациентов не отвечает на CAR Т-клеточную терапию в полной мере. Чаще всего причиной таких неудач было либо возникновение мутантного опухолевого клона (лишённого целевого белка-мишени, к которому специфичны CAR Т-клетки), либо сниженный срок жизни и функционирования CAR Т-клеток в организме пациента.

Наиболее перспективные белки-мишени для CAR T-терапии В-ALL и других новообразований В-клеточного происхождения (например, неходжкинских лимфом, NHL) – это CD19, CD20 и CD22. Поскольку эти белки в норме присутствуют также и на нормальных, В-лимфоцитах, в ходе CAR T-клеточной терапии всё В-лимфоцитарное звено оказывается уничтоженным. Наступившее в результате состояние В-клеточной аплазии может контролироваться медикаментозно, и, как правило, полное восстановление В-клеточного лимфопозза происходит в течение нескольких месяцев. Несмотря на тысячи публикаций и регистрацию на сегодняшний день семи CAR T-клеточных продуктов (одобренных FDA и EMA), не существует консенсуса относительно того, какой CAR считать «идеальным» для терапии В-ALL и NHL, притом, что именно структура CAR является наиболее значимой для обеспечения оптимальной функциональности CAR T-клеток и долговременного противоопухолевого контроля.

Таким образом, создание новых CAR, выбор оптимальной модульной структуры, а также использование альтернативных клеточных носителей для перехода к аллогенному формату CAR-терапии являются перспективными и актуальными направлениями исследований, которые обладают не только выраженным трансляционным потенциалом, но и могут служить фундаментальной основой для более глубокого понимания механизмов устойчивости к противоопухолевой терапии и консолидации заболевания. Настоящая работа ставит своей целью создание нескольких вариантов CAR к маркерам В-клеточных неоплазий CD19 и CD20, в том числе в биспецифическом варианте, а также исследует потенциал NK-клеточных носителей и модифицированных векторных конструкций.

Степень разработанности проблемы.

За последние 25 лет опубликованы тысячи работ, направленных на изучение взаимосвязей между архитектурой, модульным составом и аффинностью CAR, условиями культивирования и фенотипическим составом CAR T-клеток, эффективностью и токсичностью CAR-клеточных продуктов, как в доклинических, так и в клинических исследованиях. В мире проводится большое количество фундаментальных исследований, направленных на изучение процессов активации и истощения CAR T-клеток, поиска новых мишеней, выявления оптимальных вариантов дизайна CAR и создания альтернативных клеточных платформ: CAR NK-клеток, CAR-макрофагов и CAR-экзосом.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования является создание и характеристика CAR, специфичных к маркерам В-клеточных неоплазий, а также исследование возможности применения альтернативных клеточных носителей и “усиленных” векторных конструкций для CAR.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить CD20-специфические CAR T-клетки человека на основе scFv Leu16, 1F5 и 2F2 и провести сравнительный анализ таких CAR T-клеток *in vitro* и *in vivo*.
2. Получить CAR T-клетки, специфичные одновременно к CD19 и CD20, и провести их характеризацию в тестах *in vitro*.
3. Получить CD20-специфические CAR NK-92, YT и KHYG-1 клеточные линии и провести сравнение их активности в тестах *in vitro* и *in vivo*.
4. Выбрать оптимальную фермент/субстратную пару для проведения *in vivo* визуализации в животных моделях ксенотрансплантированных опухолей с использованием люминометрии.
5. Создать и провести сравнение прототипов "усиленных" CAR-NK-клеток человека, несущих различные активационно-индуцируемые репортёры.

Научная новизна и практическая ценность исследований

В работе впервые проведено детальное функциональное и фенотипическое сравнение трех CD20-специфичных антигенраспознающих доменов CAR в идентичном контексте. Для этого впервые в России были разработаны CAR на основе последовательностей одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) CD20-специфических моноклональных антител 1F5, Leu16 и 2F2 в векторе для лентивирусной доставки, а также получены биспецифичные и дуальные варианты CAR различной структуры, обеспечивающие *in vitro* и *in vivo* активность CAR T-клеток на уровне, не уступающем современным мировым стандартам. Таким образом, созданы предпосылки для дальнейшей модификации структуры полученных CD20-специфических CAR на основе человеческого антитела 2F2 и их тестирования в клинических испытаниях у больных с CD20-позитивными неоплазиями. Полученные результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение в области клеточной терапии В-клеточных новообразований человека.

Фермент-субстратная пара Nluc/h-целентеразин является доступной и удобной в использовании системой для проведения *in vivo* визуализации биораспределения клеток и изучения динамики опухолевой нагрузки в доклинических моделях.

В контексте двух CAR NK-клеточных линий и первичных Т-клеток человека исследована функциональность нескольких промоторных модулей для обеспечения активационно-индуцированной экспрессии целевых трансгенов. Комбинация минимального промотора гена *CD69* в сочетании с его энхансерными участками CNS1 и CNS2 позволяет добиться индуцируемой экспрессии гена-репортёра в контексте первичных Т-клеток и в перспективе может быть использована для создания "усиленных" CAR Т-клеточных продуктов нового поколения, обеспечивающих локальную секрецию терапевтически значимых молекул.

Также впервые в России проведено сравнение трех NK-клеточных линий человека, NK-92, KHYG-1, YT-1, – в качестве носителей CAR на модели лимфомы Беркитта, ксенотрансплантированной мышам линии NOD/scid. Полученные CAR NK-клеточные линии охарактеризованы по уровню экспрессии CAR и цитотоксичности против опухолевых клеток. Впервые показано, что CAR-NK клетки на основе линии KHYG-1 достоверно увеличивают продолжительность жизни мышей с ксенотрансплантированными опухолями. Также, исходя из полученных результатов, можно утверждать, что CAR NK-клеточные платформы, основанные на первичных NK-клетках и иммортализованных клеточных линиях, обладают потенциалом в качестве универсальной терапии онкологических заболеваний человека.

Методология и методы исследования

В работе использованы стандартные методы молекулярной биологии для создания целевых плазмидных конструкций: выделение и очистка плазмидной ДНК (выделение коммерческими наборами), ПЦР, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование, электротрансформация клеток бактерий *E. coli* и секвенирование полученных плазмидных конструкций по Сэнгеру.

С применением созданных плазмидных конструкций были получены лентивирусные частицы, которыми трансдуцированы первичные Т-клетки здоровых доноров и NK-клеточные линии YT-1, NK-92, KHYG-1. Полученные CAR Т- и CAR NK-клетки охарактеризованы по уровню экспрессии целевого трансгена методом проточной цитофлуориметрии. С полученными CAR Т- и CAR NK-клетками проведены стандартные тесты. Для CAR Т-клеток были оценены способность активироваться, секретировать провоспалительные цитокины после коинкубации с клетками-мишенями, способность обеспечивать CAR-опосредованный лизис клеток-мишеней в тестах на “моментальную” и “повторяющуюся” цитотоксичность, определен фенотипический состав клеточных продуктов и уровень экспрессии маркеров истощения Т-клеток, а также способность контролировать ксенотрансплантированную опухоль на модели острого лимфобластного лейкоза человека на мышах линии NSG. Проводилась прижизненная визуализация опухолевой нагрузки во временной динамике. Для CAR NK-клеток была проведена оценка *in vitro* и *in vivo* цитотоксичности.

Лентивирусные конструкции, кодирующие флуоресцентный репортёр под активационно-индуцируемыми промоторами, были проверены в первичных Т-клетках и NK-клеточных линиях в условиях TCR- и CAR-опосредованной стимуляции, с последующей проточной цитофлуориметрией.

Расчет статистической значимости выполнялся с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6. Для клеточных тестов использовался метод множественного сравнения с

использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA). Для анализа кривых выживаемости экспериментальных животных использовался логарифмический ранговый тест (тест Мантеля-Кокса). Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Положения, выносимые на защиту

1. CAR на основе последовательностей CD20-специфического человеческого антитела 2F2 обеспечивают эффективное уничтожение опухолевых В-клеток и являются перспективным решением для проведения доклинических и клинических испытаний.
2. По сравнению с другими протестированными НК-клеточными линиями, CAR НК-клеточная линия КНУГ-1, специфичная к CD20, обладает выраженным противоопухолевым эффектом *in vivo* на модели ксенотрансплантированной лимфомы Беркитта и может являться прототипом для создания универсальных CAR НК-клеток. В то же время, известные промоторные модули могут быть успешно применены в контексте Т-клеток, но не обеспечивают необходимого уровня индуцируемости "усиленных" CAR НК-клеточных линий.
3. Протестированная фермент/субстратная пара NanoLuc/h-целентеразин может успешно применяться для количественного определения и биораспределения опухолевых клеток *in vivo* с использованием системы прижизненной визуализации.

Степень достоверности результатов

В данной работе использованы современные методы исследования CAR Т- и CAR НК-клеточной терапии на модели В-клеточных онкологических заболеваний человека в тестах *in vitro* и *in vivo* (проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, люминометрия, прижизненная визуализация животных). Полученные данные демонстрируют воспроизводимость и согласуются с существующими опубликованными результатами, что свидетельствует об их надежности.

Публикации по теме диссертации

1. Беловежец Т.Н., Гладких Д.В., Омельченко В.О., Волкова О.Ю., Таранин А.В., Кулемзин С.В. NanoLuc/h-целентеразин: эффективная пара для детекции биolumинесценции *in vitro* и *in vivo*. Гематология и трансфузиология. 70(2), 2025. (doi.org/10.35754/0234-5730-2025-70-2-146-155)
2. Belovezhets, T., Kulemzin, S., Volkova, O., Najakshin, A., Taranin, A., Gorchakov, A. Comparative Pre-Clinical Analysis of CD20-Specific CAR T Cells Encompassing 1F5-, Leu16, and 2F2-Based Antigen-Recognition Moieties. Int J Mol. Sci, 24, 2023. (doi.org/10.3390/ijms24043698)

3. Kulemzin S., Evsyukov I., Belovezhets T., Taranin A., Gorchakov A. Horses for courses in the era of CARs: Advancing CAR T and CAR NK cell therapies. *J Pers Med* 11(11), 2021. (doi: 10.3390/jpm11111182)
4. Kulemzin, S.V., Matvienko, D.A., Sabirov, A.H. et al. Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and CAR NK-cell lines. *BMC Med Genomics* 12 (Suppl 2), 44, 2019. (doi.org/10.1186/s12920-019-0489-4)
5. Беловежец Т.Н., Горчаков А.А., Самочерных К.А., Кулемзин С.В. Сравнительный анализ химерных антигенных рецепторов с двойной специфичностью к CD19 и CD20. *Российский журнал персонализированной медицины*. 4(5), 2024. (doi.org/10.18705/2782-3806-2024-4-5-413-420)

Тезисы конференций

1. Belovezhets T.N., Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Chikaev A.N., Koval O.A., Kuligina E.V., Taranin A.V. Comparative *in vitro* analysis of human NK-cell lines expressing chimeric antigen receptors. *Cellular Therapy and Transplantation* 7(3): 24-25, 2018.
2. Беловежец Т.Н. Сравнительный анализ *in vitro* активности Т-клеток с CD20-специфичным химерным антигенным рецептором на основе человеческого антитела офатумумаб. *Cellular Therapy and Transplantation* 8(3): 35-37, 2019.
3. Беловежец Т.Н., Кулемзин С.В., Горчаков А.А. Разработка и тестирование новых CAR Т-клеточных продуктов в онкогематологии. *Клиническая онкогематология* 17(S1): 11-12, 2024.

Апробация работы

1. XII, XIII, XIV, XV и XVI Международные симпозиумы памяти Р.М. Горбачевой "Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия", Санкт-Петербург.
2. VIII Всероссийская конференция с международным участием "Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий", симпозиум "Генная и клеточная терапия", Санкт-Петербург.
3. IV Инновационный Петербургский медицинский форум, Санкт-Петербург.
4. Научная школа-конференция "Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины", Новосибирск.

5. IX Всероссийская конференция с международным участием "Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий", Санкт-Петербург.
6. VI Конгресс гематологов и III Конгресс трансфузиологов России, Москва.
7. Конференция Российского общества онкогематологов "Клеточная иммунотерапия в лечении онкогематологических заболеваний у взрослых", Москва.

Вклад автора

Автор диссертационной работы участвовала в разработке всех этапов диссертационной работы, в формулировании целей и задач, получении, анализе и обсуждении экспериментальных данных, а также в подготовке научных публикаций. Автор самостоятельно проводила молекулярные и клеточные эксперименты (получала необходимые плазмидные конструкции, получала, культивировала и характеризовала первичные CAR T-клетки и НК-клеточные линии, получала модели ксенотрансплантированных опухолей на мышах линий NOD/scid и NSG, анализировала результаты при помощи проточной цитометрии). Прижизненную визуализацию ксенотрансплантированных опухолей проводил Д.В. Гладких (ИХБФМ СО РАН). Получение высокоочищенных препаратов плазмидной ДНК проводил А. М. Наякшин. А. А. Горчаков участвовал в создании плазмидных конструкций и планировании экспериментальных работ. Плазмидные конструкции для тестирования активационно-индуцируемых промоторов получены А. Х. Сабировым.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, а также выводов и списка цитируемой литературы, включающего 507 ссылок. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц, 29 рисунков и приложение на 1 странице.

Благодарности

Автор выражает признательность д.б.н А. В. Степанову (ИБХ РАН) за предоставленную клеточную линию Raji-ffluc, а также Д.В. Гладких и чл.-кор. РАН, проф., д. б. н. М. А. Зенковой (ИХБФМ СО РАН) за поддержку проведения экспериментов по прижизненной визуализации животных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Онкологические заболевания В-клеточной природы

Онкологические заболевания В-клеточной природы являются достаточно распространенными и поражают пациентов всех возрастных групп. Классификация таких заболеваний проводится по типу трансформированных клеток, стадии дифференцировки, морфологии, иммунофенотипу, первичной локализации/ведущему компартменту поражения (костный мозг, кровь, лимфоузлы, селезенка и т. д.), клинической картине, наличию хромосомных перестроек и/или молекулярным маркерам. В случае, когда основной очаг заболевания находится в костном мозге и трансформация произошла в ранних предшественниках В-клеток, заболевание относят к В-ALL; хронический лимфолейкоз (CLL) возникает при трансформации зрелых антиген-специфичных В-клеток и характеризуется накоплением опухолевых клеток в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных органах (в первую очередь лимфоузлах). В целом в популяции В-ALL – редкое заболевание, однако его частота высока у детей до 5 лет [1]; наоборот, CLL – преимущественно болезнь пожилых пациентов (медианный возраст диагностики 70-72 года) [11]. Хотя на сегодняшний день определены далеко не все механизмы и оптимальные мишени для отдельных подтипов и, особенно, для рецидивов В-ALL, известен широкий спектр повторяющихся генетических драйверов/подтипов (например, BCR-ABL1/Ph+, ETV6-RUNX1, MLL(KMT2A)-перестроенные, гипердиплоидия, Ph-like и др.), и именно эти молекулярно-цитогенетические маркеры лежат в основе современной стратификации риска и выбора терапии. В общем случае, ситуация с терапией В-ALL продолжает оставаться тяжелой, несмотря на имеющийся арсенал таргетных и нетаргетных подходов. В то время как выживаемость педиатрических пациентов превышает 85% [12,13] и большая часть полностью излечивается даже после одного рецидива [14], ситуация со взрослыми пациентами гораздо более серьезная. Общая выживаемость взрослых пациентов, страдающих этим заболеванием, находится в пределах 40-50%, однако, если болезнь переходит в рецидивирующую форму, то пятилетняя выживаемость составляет всего 10% [1,15,16] – и эта цифра остается неизменной на протяжении последних 20 лет, несмотря на развитие все новых способов терапии, которые действенны, к сожалению, только в отношении первичных случаев болезни. В любом случае, независимо от возраста пациентов, терапевтический инструментарий для терапии рецидивирующих лейкозов достаточно ограничен и долговременный прогноз выживаемости таких пациентов негативен [17]. При этом пятилетняя относительная выживаемость пациентов с CLL составляет около 89%, однако проблемой этого заболевания является то, что у большинства пациентов в течение жизни развивается рецидив. Известно несколько молекулярных и цитогенетических маркеров CLL, например, del(17p)/мутации TP53,

мутированный/немутированный статус IGHV, сложный кариотип, del(11q), трисомия 12-й хромосомы, которые характерны для пациентов с длительным контролем и хорошим ответом на терапию или наоборот, для тех, у кого рецидив/рефрактерность наступают рано.

Лимфомы – это заболевания лимфоидной ткани, характеризующиеся преимущественно тканевым ростом (увеличением лимфатических узлов и/или экстранодальными очагами во внутренних органах), в которых происходит бесконтрольное накопление онкотрансформированных зрелых (в большинстве случаев) лимфоцитов. Существует большое разнообразие В-клеточных лимфом, которые отличаются патогенезом и общим течением заболевания. Так, среди лимфом выделяют лимфому Ходжкина, с особым гистологическим патогенезом и наличием клеток Рида-Штернберга, и неходжкинские лимфомы (NHL), на долю которых приходится по разным источникам от 70 [18] до 85% [19–21] всех лимфом. Наиболее часто встречаются диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) (25-50%) [18,22,23] и фолликулярная лимфома (FL) (20%) [24], но также мантийноклеточная лимфома (6%) [25] и лимфома маргинальной зоны (7%) [26,27]. Помимо генетических драйверов (перестроек и мутаций в генах BCL2, BCL6, MYC, TP53, CCND1), развитие отдельных В-клеточных лимфом напрямую или косвенно связано с действием вирусных факторов, таких как EBV [28–30], HHV-8 [31] и HIV-1 [28,29,32]. Все лимфомы условно подразделяют на две группы: агрессивные формы и индолентные (вялотекущие) (Таблица 1).

Таблица 1. Подтипы В-клеточных лимфом

Агрессивные формы	Индолентные (вялотекущие) формы
Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома Лимфома Беркитта Внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома Фолликулярная лимфома (высокой степени злокачественности) В-клеточная лимфобластная лимфома Мантийноклеточная лимфома Лимфоматоидный гранулематоз (высокая степень злокачественности) Плазмобластная лимфома	Фолликулярная лимфома (низкой степени злокачественности, степень 1-2, 3А) Макроглобулинемия Вальденстрема Лимфома маргинальной зоны Малоклеточная лимфома

Общая выживаемость при DLBCL существенно зависит от агрессивности заболевания, клинико-биологических факторов риска и ответа на первую линию терапии. По современным популяционным данным 5-летняя относительная выживаемость при DLBCL составляет около 65%, хотя при неблагоприятных вариантах течения и распространенных стадиях она заметно ниже и находится примерно на уровне 56–58% [33,34]

В последние десятилетия прогноз при множественной миеломе заметно улучшился: по современным данным, 5-летняя относительная выживаемость составляет около 62,4%, а в обзорах отмечается, что 5-летняя общая выживаемость выросла с примерно 32% в 1990-х годах до более 60% в последние годы [35,36].

Вероятность рецидива после самых агрессивных вариантов химиотерапии в течение одного-двух лет составляет для В-ALL у взрослых пациентов – 44% [37,38], тогда как в педиатрической популяции рецидив развивается значительно реже – примерно у 10–15% пациентов [39]. Для лимфомы Беркитта при современных интенсивных протоколах частота рецидива относительно невелика и обычно оценивается в пределах 5–12% в зависимости от когорты и схемы лечения [40,41]. В случае DLBCL частота возникновения рецидива или первичной рефрактерности составляет около 30–40% [42]. Для CLL после интенсивной химио-иммунотерапии рецидивы в целом остаются правилом, хотя у части пациентов, особенно с мутированным IGHV, ремиссии могут быть длительными; в крупных исследованиях примерно половина больных не имеет прогрессии к 5 годам [43]. Для множественной миеломы даже после наиболее интенсивных современных подходов, включая аутологическую трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, заболевание обычно сохраняет рецидивирующий характер, а медиана выживаемости без прогрессирования составляет примерно 4 года, будучи существенно короче у пациентов высокого риска [44].

1.2. Терапия при помощи CAR T-клеток

Появление CAR T-клеточной терапии существенно расширило терапевтический арсенал онкогематологов и позволило рассчитывать на более высокую частоту полных ответов и бессобытийной выживаемости для самых тяжело поддающихся лечению групп пациентов. Однако на сегодняшний день частота возвращения заболевания составляет порядка 30-60% в зависимости от нозологии, опухолевой нагрузки и общей предлеченности пациента [45–47].

Антигенраспознающая область CAR, как правило, состоит из последовательностей моноклональных антител в формате scFv (соединенные гибким линкером переменные районы легких и тяжелых цепей) и, таким образом, CAR-терапия и терапия антителами схожи по принципу распознавания поверхностных антигенов (информация об отличиях приведена в

разделе 1.2.2). Основные белковые мишени как для нацеливания антител, так и CAR T-клеток, используемые в контексте В-клеточных онкозаболеваний, – это маркеры нормальных В-клеток: CD19, CD20, CD22, и BCMA [48–50]. В норме эти белки экспрессируются только на В-лимфоцитах, причем на конкретных стадиях лимфопоэза (рис. 1).

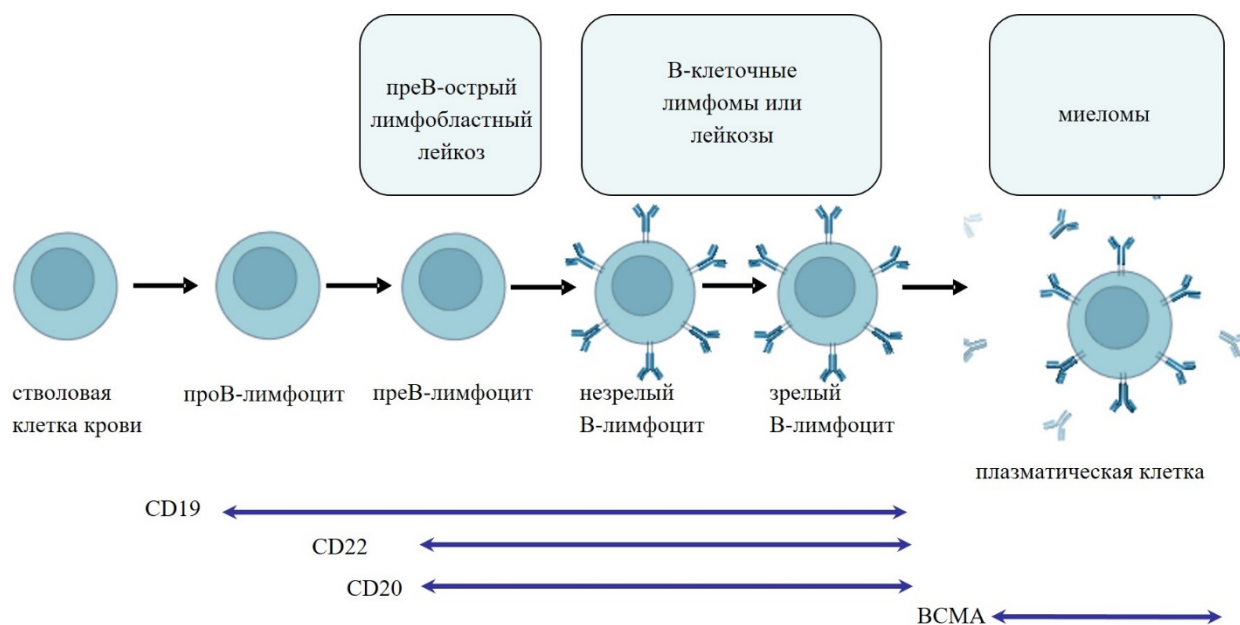


Рисунок 1. Схема В-клеточного лимфопоэза, постадийная экспрессия В-клеточных маркеров CD19, CD20, CD22 и BCMA и клеточные типы, претерпевающие опухолевое перерождение при В-клеточных лейкозах, лимфомах и миеломе (с модификациями из [51]).

Адоптивная иммунотерапия CAR T-клетками заключается в переносе пациентам их собственных Т-клеток, которые были предварительно размножены и модифицированы *ex vivo* таким образом, чтобы на их поверхности присутствовали специальные молекулы – химерные антигенные рецепторы (CAR). Использование CAR позволяет специфически и HLA-независимо перенаправлять цитотоксическую активность Т-лимфоцитов против выбранных популяций клеток, например, опухолевых (рис. 2). Поскольку данный подход сочетает в себе селективность антител и цитотоксический потенциал Т-клеток, неудивительно, что его применение в рамках клинических испытаний позволило получить великолепные результаты в плане терапии пациентов с различными онкогематологическими заболеваниями.

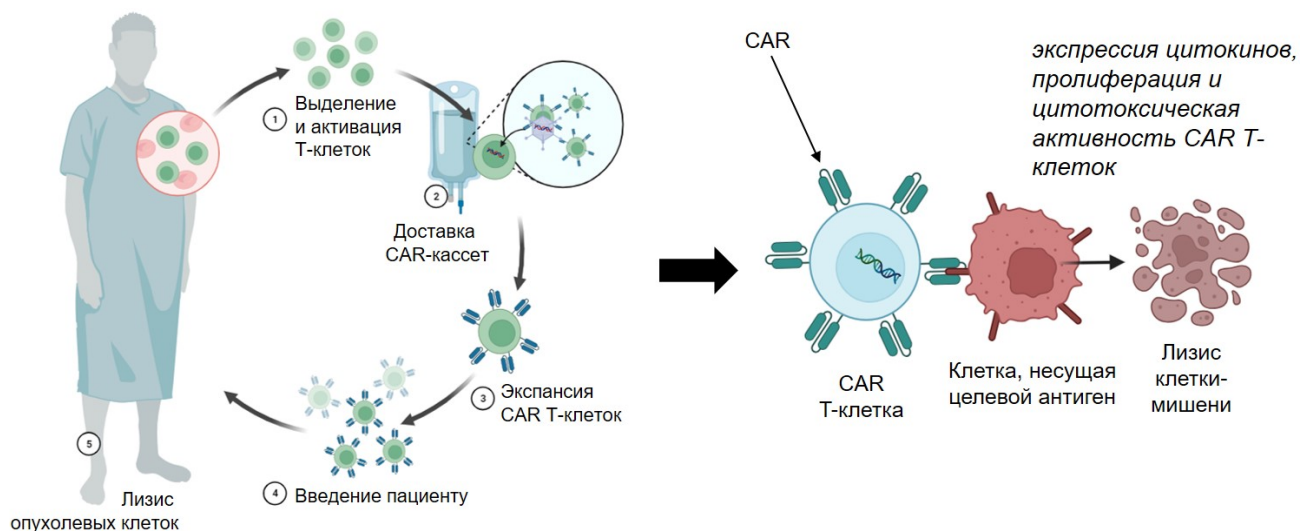


Рисунок 2. Принцип адоптивного переноса аутологичных CAR Т-клеток. При помощи лейкофереза Т-клетки периферической крови онкобольного выделяют для культивирования *ex vivo*. После трансдукции Т-клеток кодирующими CAR лентивирусными частицами [52,53], гамма-ретровирусными частицами [54,55] или при помощи транспозонов [56,57], полученные CAR Т-клетки размножают перед введением обратно пациенту. Попав в организм пациента, CAR Т-клетки встречаются с опухолевыми клетками, несущими на поверхности мишень. Взаимодействие CAR с мишенью влечет за собой активацию CAR Т-клеток, которая выражается в секреции цитокинов, пролиферативной реакции и уничтожении клеток-мишеней.

1.2.1. CAR Т-клеточная терапия в контексте В-клеточных неоплазий

В 2007 году были опубликованы убедительные доклинические данные [58], позволившие впоследствии перейти к тестированию CD19-специфичных CAR Т-клеток на пациентах [5,59,60], и в 2017 году FDA впервые одобрило два CAR Т-клеточных продукта *tisa-cel* (Novartis) (для пациентов до 25 лет с *t/t* В-ALL и взрослых с LBCL и FL) и *axi-cel* (KITE-Pharma) (для пациентов с LBCL и FL). По состоянию на декабрь 2025 года одобрено уже семь различных продуктов (5 против CD19 (В-клеточные лимфомы и лейкозы) и 2 против BCMA (множественная миелома)), а в рамках клинических испытаний CD19-CAR Т-клеточных продуктов участвовало несколько сотен пациентов с *t/t* В-ALL, а также NHL, и полная ремиссия была достигнута у 70-90% пациентов [5,60]. Кроме того, были созданы и находятся на разных стадиях клинической апробации и CAR против других антигенов, часто представленных на перерожденных В-клетках (CD20, CD22, CD23, CD30, CD37, CD38, CD70, CD79a, CD79b, CD138, Igκ, BAFF-R, GPRC5D, FcRL5, ROR1, LMP1 (антиген EBV) и др) [61–66].

На сегодняшний день оптимизм относительно длительности бессобытийной выживаемости при В-ALL несколько снизился. При более длительном наблюдении стало ясно, что значительная часть ремиссий не является устойчивой: в исследовании ELIANA 3-летняя бессобытийная выживаемость составила лишь 44% при общей частоте ремиссий 82% [46]. Для DLBCL исходный энтузиазм также был связан с высокой активностью терапии у крайне

неблагоприятных пациентов, однако при длительном наблюдении лишь часть этих ответов сохранялась: в 5-летнем анализе ZUMA-1 сохраняющийся ответ отмечался у 31% пациентов, а 5-летняя общая выживаемость составила 42% [67].

Относительно недавно (2021 и 2022 гг. соответственно) были одобрены два BCMA-специфических CAR T-клеточных продукта для терапии пациентов с множественной миеломой: ide-cel (Bristol-Myers Squibb Company) и cilta-cel (Janssen Biotech, Inc.) На начало 2026 года для терапии миеломы зарегистрировано около 170 клинических испытаний CAR T-клеток против антигенов BCMA, GPRC5D, SLAMF7, LewY, Igk, CD38, FcRL5, CD138, CD44v6, CD56 и комбинаций GPRC5D/BCMA, SLAMF7/BCMA. Несмотря на то, что у подавляющего числа пациентов CD19 не экспрессируется на самих миеломных клетках, а только на клетках на более ранних стадиях дифференцировки (см. рис. 1), были инициированы успешные клинические испытания CD19-, а также CD19/BCMA- и CD19/CD22/BCMA-специфических CAR T-клеточных продуктов. Данные работы были основаны на гипотезе о существовании редкого клонально связанного CD19-положительного В-клеточного компартмента, потенциально вовлеченного в поддержание опухолевого клона и развитие рецидива [68], а также данных о том, что на клетках миеломы, вопреки устоявшемуся мнению, может присутствовать сверхнизкая плотность CD19, не выявляемая стандартной проточной цитометрией, но достаточная для распознавания и элиминации CD19-CAR T-клетками [69]. В реальной клинической практике одобренные CAR T-клеточные препараты при множественной миеломе обеспечивают высокую частоту глубоких ответов, однако, у многих пациентов ремиссии остаются ограниченными по длительности. Для ide-cel частота полных ответов составляет около 42%, медиана общей выживаемости – 12,5 месяца [70], тогда как для cilta-cel полный ответ достигается примерно у 70% больных, но и в этом случае значительная доля пациентов впоследствии рецидивирует [71]. Основными причинами считаются потеря экспрессии BCMA [72,73], недостаточная персистенция/истощение CAR T-клеток и иммуносупрессивное микроокружение костного мозга [74].

Таким образом, список CAR T-клеточных мишеней для лечения онкогематологических заболеваний В-клеточного генеза постоянно расширяется. При этом возникает закономерный вопрос: зачем вообще вести разработки CAR T-клеток против дополнительных В-клеточных мишеней, если уже одобренные CD19-специфические CAR T-клетки в значительной степени решают вопрос терапии В-клеточных лейкозов и лимфом?

Во-первых, для тех самых пациентов, кому CD19-CAR T-клеточная терапия не помогла, было описано появление CD19-негативных опухолевых клеток [75]. Соответственно, это открывает простор для использования других CAR, например, специфично узнающих CD20, а также для использования “двойных” (би-специфичных) CAR T-клеток, узнающих CD20 и CD19

[76,77], а также “тройных” CD19/CD22/BCMA CAR Т-клеток [78], что позволяет минимизировать описанный выше эффект “ускользания” опухолевых клеток из-под давления моноспецифической CAR Т-терапии. Механизмы такого процесса достаточно обширны, однако, основными считаются мутации CD19, альтернативный сплайсинг, потеря/маскирование эпитопа, переключение класса и трофоцитоз, приводящие к потере поверхностного CD19, в то время как CAR Т-клетки остаются функциональными [9,79–82].

Во-вторых, необходимо учитывать и тот факт, что при терапии CD19-специфичными CAR Т-клетками уничтожаются все без исключения В-клетки, начиная от проВ-лимфоцитов – и нормальные, и опухолевые, что может негативно сказаться на состоянии пациента (развивается долговременная В-клеточная аплазия и гипоглобулинемия). Ввиду более ограниченного паттерна экспрессии CD20 терапия CD20-CAR Т-клетками не затрагивает проВ-лимфоциты (рис. 1), и в меньшей степени повреждает гуморальное звено иммунитета [83]. Таким образом, CD20-CAR Т-клеточная терапия может оказаться более предпочтительным вариантом с позиции расширения терапевтических возможностей для пациентов с лекарственно-устойчивыми и рецидивирующими формами В-клеточных лейкозов, а также NHL.

1.2.2. Сравнение терапии CAR Т-клетками с терапией моноклональными антителами

Почему происходят рецидивы В-клеточных заболеваний, несмотря на применение того же ритуксимаба, селективно уничтожающего CD20-позитивные В-клетки, и чем терапия CAR Т-клетками отличается от терапии моноклональными антителами, узнающими те же антигены? Для ответа на эти вопросы нужно разобраться в том, какие существуют механизмы устойчивости к терапии моноклональными антителами вообще и ритуксимабом в частности. К ним относятся:

- 1) снижение уровня поверхностной экспрессии CD20 – за счет спонтанного метилирования промоторной области гена *MS4A1*, кодирующего CD20 [84,85];
- 2) FcγRIIb-опосредованная интернализация комплекса CD20/антитело [86,87]
- 3) изменение последовательности CD20 из-за мутации или изменения сплайсинга [88–91];
- 4) истощение системы комплемента [92];
- 5) периферическое связывание антител (antigen sink) с нормальными В-клетками и секретируемыми опухолевыми В-клетками экзосомами [93];
- 6) изменение уровня экспрессии опухолевыми клетками про- и антиапоптотических белков [94];
- 7) ингибирование CDC за счет повышения опухолевыми клетками экспрессии CD55 и CD59 [95,96];

8) недоступность опухолевых В-клеток для уничтожения антителами в иммунопривилегированных органах и тканях [97,98].

Необходимо отметить, что три последних механизма резистентности могут представлять серьезную проблему для терапии антителами, но никак не CAR Т-клетками, которые уничтожают свои мишени посредством прямого цитолиза и способны эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и атаковать оставшиеся там бластные клетки [99–101]. Вместе с тем, снижение уровня экспрессии CD20 и появление мутаций в нем могут представлять проблему и для CAR Т-клеток, так как эти события будут снижать эффективность распознавания целевого эпитопа на клетках-мишенях. Для решения этой проблемы недавно было предложено стимулировать ре-экспрессию CD20 при помощи нескольких классов лекарственных средств, таких как ингибиторы ДНК-метилтрансфераз [102], ингибиторы деацетилаз гистонов [103,104] и гипометилирующие агенты [105].

Кроме классических моноклональных антител, имеющих стандартную Y-образную структуру IgG, в клинической практике появляется все больше представителей другого формата, а именно биспецифических активаторов Т-клеток (BiTE), – типичным представителем этого класса является препарат блинатумумаб (CD19xCD3) (рис. 3). BiTE одновременно связывают антиген на поверхности клетки-мишени и активируют Т-клетки, взаимодействуя с CD3 на их поверхности, тем самым вовлекая их в процесс направленного уничтожения опухолевых клеток. Также существуют биспецифические антитела, имеющие классическую или близкую к ней структуру, но связывающие одновременно несколько антигенов: мосунетузумаб, одронекстамаб и глофитамаб (CD20xCD3).

Таким образом, биспецифические антитела создают конкуренцию CAR Т-клеточной терапии за счет большей доступности и меньшей цены, а также возможности точного дозирования, в то время как эффективность оказывается сравнимой в контексте ряда заболеваний, например, позволяя таргетировать альтернативный антиген для терапии множественной миеломы, в случае, когда анти-BCMA терапия оказывается невозможной [106]. Тем не менее, CAR Т-клетки “выигрывают” в терапии агрессивных форм В-клеточных лимфом, фолликулярной лимфоме и множественной миеломе, обеспечивая более высокие показатели частоты полного ответа и общей/бессобытийной выживаемости в течение одного года, но в то же время обеспечивая более высокую частоту тяжелых побочных эффектов [107–109].

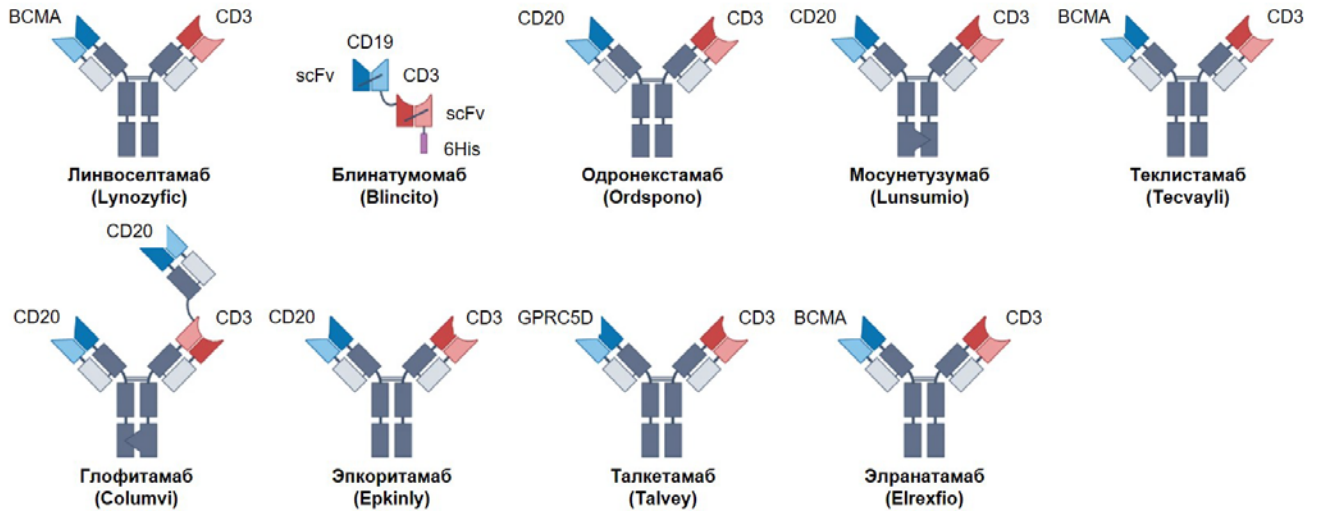


Рисунок 3. Структуры биспецифических антител и биспецифических активаторов Т-клеток (BiTE), одобренных к использованию или находящихся на последней стадии клинических испытаний в контексте В-клеточных новообразований (с изменением из [110]).

1.3. CD20 как мишень CAR Т-клеточной терапии

1.3.1. Строение и функции CD20

CD20 – это средний по размеру (297 а.о.) негликозилированный мембранный фосфобелок, принадлежащий к семейству MS4A [111]. Кодированный CD20 ген *MS4A1* расположен в районе q12 11 хромосомы и состоит из 8 экзонов. Как N-, так и C-конец CD20 находятся в цитоплазме, закрепление белка на мембране происходит благодаря четырем гидрофобным участкам. Внеклеточные последовательности CD20 образуют две петли – большую и малую (рис. 4). Интересно, что эпитопы подавляющего числа моноклональных антител находятся в пределах большой петли CD20. По-видимому, это связано с тем, что именно этот район наиболее дивергирован между мышинным и человеческим белками и тем самым при иммунизации мышей происходит фокусировка иммунного ответа против большой петли CD20 человека.

Несмотря на то, что сам белок CD20 был описан еще в 1980 году [112,113], его функция остается не до конца очевидной; по-видимому, он является вспомогательной субъединицей одного из кальциевых каналов [114], а паттерн его экспрессии ограничен пре-В и В-лейкоцитами (рис. 1).

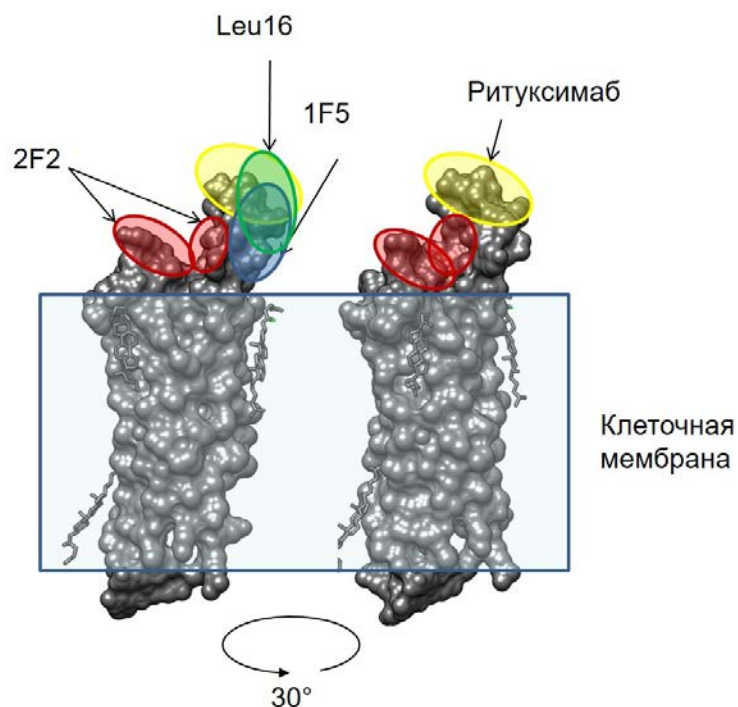


Рисунок 4. Схематическое изображение структуры CD20 и участков внеклеточных петель, которые узнаются различными антителами. 1 – участок, узнаваемый ритуксимабом; 2 – офатумумабом (2F2); 3 – 1F5; 4 – Leu16 (с изменением из [115]).

1.3.2. CD20-CAR в клинических испытаниях

На данный момент нет одобренных к применению CD20-специфичных CAR T-клеточных продуктов, однако ряд групп проводят активные исследования в данном направлении (Таблица 2).

Таблица 2. Клинические испытания CD20-специфичных CAR T-клеток

Продукт	Номер исследования	Мишень	Предварительные результаты	Ссылка на исследование
MB-106	NCT03277729	CD20	2CR, 1 PR и 1 MR, контролируемая токсичность	[116]
C-CAR066	NCT04036019 NCT04316624	CD20	Эффективен после неудачи анти-CD19 CAR T	[62]
LY007	NCT06279611	CD20	92% ORR, высокий уровень безопасности	[61]

			применения	
LV20.19	NCT04186520	CD19/20	100% ORR, из них 92% CR, 8% PR	[76]
HEM-ONCO-006	NCT04723914	CD19/20	90 % ORR, из них 70% CR	[117]
LYL314	NCT05826535	CD19/20	93% ORR, из них 73% CR	[118]
-	NCT05418088	CD19/20/22	40% CR, контролируемая токсичность	[119]
TriCAR19.20.22	NCT07168486	CD19/20/22	нет опубликованных результатов	[120]
CAR20.19.22	NCT05094206	CD19/20/22	0% ORR, исследование остановлено	[121]

Анализ ландшафта клинических испытаний показывает, что используется как CD20-моноспецифичная терапия, так и CAR T-терапия в би- и триспецифичном формате и одновременное введение продуктов двух специфичностей [76,119,122].

Моноспецифичные CD20-CAR были разработаны двумя исследовательскими группами, при этом они конструировали свои CAR на основе последовательностей мышинных моноклональных антител Leu16 [83,123] и 1F5 [124,125]. Интересно, что в испытаниях 1F5(CD20)-CAR группой Zhang и соавт. пациенты, ранее получавшие инъекции ритуксимаба, значительно хуже отвечали на терапию CD20-CAR. В первом клиническом испытании Leu16(CD20)-CAR T-лимфоцитов участвовало всего 3 пациента, при этом у пациента с ритуксимаб-устойчивой опухолью также был самый слабый ответ на терапию. Более поздние работы показывают, что даже несмотря на устойчивость к ритуксимабу, CD20-специфичные CAR T-клетки могут быть вполне эффективными. Вероятно, это связано с более эффективным проникновением CAR T-клеток в опухолевые очаги и прямой цитотоксичностью, не требующей привлечения дополнительных иммунных клеток. Тем не менее, стоит отметить, что в данном

исследовании группа пациентов (n=3), получавших терапию ритуксимабом менее, чем за 3 месяца до CAR T-клеточной терапии, демонстрировала сниженный ответ на терапию [126].

Существует вероятность того, что ритуксимаб-устойчивые клетки могут хуже распознаваться CAR T-клетками на основе антител Leu16 и 1F5, так как оба эти антитела узнают эпитопы, частично перекрывающиеся с сайтом связывания ритуксимаба (рис. 4), и что, вероятнее всего, не позволяет им эффективно опознавать мутантные формы CD20, возникшие под давлением терапии ритуксимабом. Кроме того, для Leu16 показана высокая схожесть структуры самого антитела с ритуксимабом (примерно 91% совпадения) [127].

Также существуют опасения, что остаточный уровень ритуксимаба в крови пациента может препятствовать эффективности CD20-направленной CAR T-клеточной терапии в том числе за счет маскирования самого эпитопа или создания стерических затруднений для корректного позиционирования CAR T-клетки относительно клетки-мишени. Чтобы прояснить этот вопрос, группой под руководством Брайана Тилла (США) был определен уровень концентрации ритуксимаба, снижающий активность CD20-специфичных CAR T-клеток. Для подавляющего большинства пациентов остаточная концентрация ритуксимаба составляла 100 мкг/мл или менее, при этом медианное значение было менее 40 мкг/мл. В этом диапазоне концентраций ритуксимаба CD20-специфические CAR T-клетки сохраняли значительную активность как *in vitro*, так и *in vivo*, более того, функция CAR T-клеток не нарушалась *in vivo* в мышинной модели при концентрациях ритуксимаба, которые были значительно выше ожидаемых значений для большинства пациентов в будущих клинических испытаниях CAR T-клеток [128].

Также известно, что при использовании CAR, антигенраспознающие области которых заимствованы от мышинных антител, против них может возникать иммунный ответ [129,130]. Поэтому с нашей точки зрения представляется перспективным создание CAR T-клеток на основе антигенраспознающей части антитела 2F2 (офатумумаб). Это полностью человеческое антитело нового поколения против CD20, которое, во-первых, обладает очень высокой аффинностью (4 нМ) [131,132], во-вторых, взаимодействует с малой внеклеточной петлей CD20 [133], – районом, отличным от эпитопа ритуксимаба (рис. 4).

1.4. Структура и состав CAR

«Классический» дизайн CAR – это единая полипептидная цепочка, пронизывающая мембрану клетки и состоящая из нескольких основных структурно-функциональных доменов – антигенраспознающего, шарнирного, трансмембранного и сигнального (рис. 5).

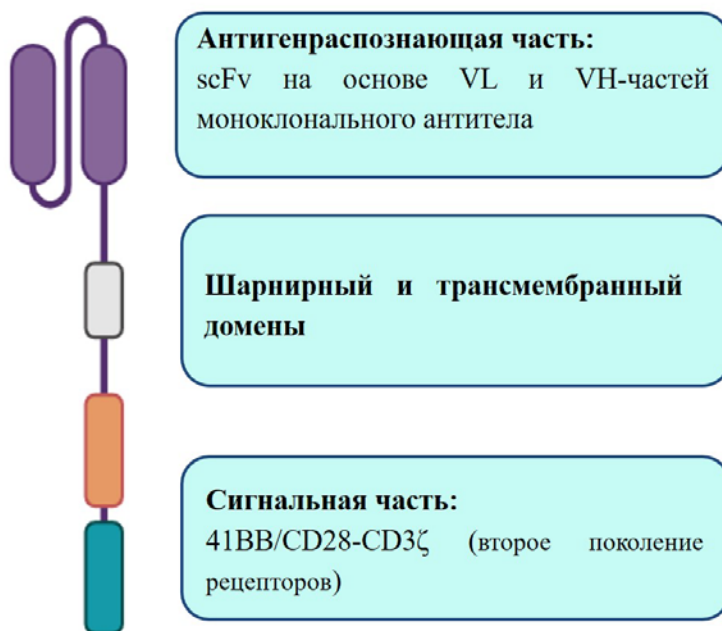


Рисунок 5. Организация CAR в мономерном виде [134].

1.4.1. Антигенраспознающий домен CAR

В литературе описано большое разнообразие различных форматов антигенраспознающего домена CAR, однако самым распространенным вариантом является scFv (соединённые линкером переменные домены лёгкой и тяжёлой цепей антител), так как большинство моноклональных антител, которые берутся за основу для данного формата, либо детально охарактеризованы на доклинических моделях, либо уже разрешены для применения в клинике. А это, в свою очередь, сильно снижает (хотя и не исключает) риск развития непредвиденной перекрёстной реактивности CAR T-клеток против здоровых тканей человека. Также для таких антител, как правило, существуют данные структурного анализа. Тем не менее, у этого формата имеется и ряд недостатков. Во-первых, для scFv-CAR T-клеток, за исключением нацеленных на B-клеточные маркеры, такие как CD19 и CD22, существует вероятность развития иммунного ответа пациента против мышинных последовательностей (human anti-mouse antibody, HAMA) и/или гуманизированных фрагментов, линкеров и неоэпитопов на стыках модулей, включая антитела против лекарственного препарата (anti-drug antibodies, ADA) и/или T-клеточные ответы [129,135–137], что может приводить не только к тяжелым анафилактическим реакциям, но и к преждевременной элиминации CAR T-клеток и, как следствие, снижению эффективности терапии [138,139]. Во-вторых, scFv имеют достаточно большой размер и стабилизированы за счет внутримолекулярных дисульфидных связей, что может осложнять создание би- и тем более мультиспецифических CAR [140]. Наконец, было показано, что каркасные последовательности переменных доменов антител, входящие в состав scFv, могут вызывать лиганд-независимую

кластеризацию CAR, что может приводить к неспецифической активации, называемой тоническим сигналингом, и, соответственно, раннему истощению модифицированных Т-клеток [141–144]. Данное явление в разной степени присуще для подавляющего большинства CAR, за исключением CD19-CAR на основе моноклонального антитела FMC63. Известно, что многие CAR, подверженные тоническому сигналингу, проявляют высокую противоопухолевую активность только *in vitro*, а во время *ex vivo* и *in vivo* экспансии такие CAR Т-клетки достаточно быстро истощаются даже при дополнительной стимуляции цитокинами [141]. В этой связи интересно отметить, что степень проявления тонического сигналинга зависит еще и от выбора костимулирующего домена CAR (см. ниже): в ряде моделей костимуляция на основе последовательностей CD28 усиливает истощение, вызванное тоническим сигналингом, тогда как костимуляция через 4-1BB может частично его смягчать [145]. Более того, существуют данные, свидетельствующие о том, что тонический сигналинг – это не всегда плохо, и, например, в контексте CAR на основе 4-1BB такая фоновая активация в отсутствие антигена приводит к активации провоспалительных генов и увеличению эффекторной функции [145]. Таким образом, создание CAR, не подверженных тоническому сигналингу или с очень точно подобранным уровнем тонического сигналинга, является важной задачей, поскольку это свойство имеет прямое отношение к долговременному поддержанию популяции CAR Т-клеток в активном состоянии и тем самым к эффективному контролю над опухолью [146–148].

Выбор антигенраспознающего домена зачастую является критическим в структуре самого рецептора. Одним из параметров, на который необходимо обращать внимание при выборе или *de novo* создании – уровень аффинности такого домена, а точнее, соотношение констант ассоциации/диссоциации (K_{on}/K_{off}). Как показала практика, еще одной проблемой формата scFv является традиционно слишком высокая аффинность большинства таких модулей. Долгое время считалось, что для увеличения вероятности распознавания и последующего уничтожения клеток-мишеней, особенно с низкой плотностью поверхностной экспрессии целевого антигена, антигенраспознающая область CAR должна обладать высокой аффинностью к антигену. Однако, на практике оказалось, что взаимосвязь между аффинностью и эффективностью CAR далеко не линейна. По сути, при дизайне CAR не вполне учитывалась кинетическая составляющая продуктивного взаимодействия между CAR Т-клеткой, уничтожаемой ею клеткой-мишенью и перехода к поиску и уничтожению следующей клетки-мишени (так называемая серийная цитотоксичность, *serial killing*) – соответственно, наиболее активными CAR оказались варианты, в которых за счет высокой константы скорости ассоциации k_{on} (и высокой аффинности) CAR Т-клетки быстро связывались с клетками-мишенями, причем в широком диапазоне уровня поверхностной экспрессии антигена, но время этого взаимодействия не было слишком

продолжительным (высокая константа скорости диссоциации, koff), позволяя тем самым CAR T-клетке быстро переходить к лизису новых клеток-мишеней. Помимо этого, высокая аффинность в сочетании с высокой плотностью антигена зачастую приводит к трофоцитозу – явлению обмена фрагментами мембран между образующими синапс клетками (CAR T-клетками и клетками-мишенями), в результате чего, например, CAR T-клетки начинают экспонировать на своей поверхности целевые антигены и уничтожаться другими CAR T-клетками (кросс-цитотоксичность или фратрицид) или же CAR переносится на мембрану клетки-мишени и тем самым закрывает целевой антиген от узнавания CAR T-клетками. Кроме того, было описано явление “потолка аффинности”, показывающее, что увеличение аффинности выше определенного порога не обязательно приводит к повышению цитотоксичности [270]. Наконец, все больше появляется данных о преимуществе низкоаффинных CAR, применение которых не только не приводит к снижению эффективности или времени персистенции, но и фактически может быть более безопасной альтернативой, поскольку снижаются риски тяжелых побочных нежелательных явлений, таких как синдром выброса цитокинов и нейротоксичности [143]. Таким образом, на сегодняшний день целевая аффинность CAR остается областью проб и ошибок и в значительной части случаев корректируется в зависимости от характерного диапазона плотности антигена на опухолевых клетках [271–274].

В качестве альтернативы scFv набирает популярность использование так называемых нано-антител. Они представляют собой VHH-домены антител животных семейства Верблюдовые (*Camelidae*) (рис. 6). Такие антитела были впервые описаны Hamers-Castermans и соавторами в 1993 году [149]. Считается, что в сочетании с низкой иммуногенностью, размер и структура таких антител идеально подходят для конструирования мультидоменных рецепторов [150]. Так, CAR T-клеточный препарат ciltacicept, зарегистрированный для терапии множественной миеломы, содержит в качестве антигенраспознающего домена два различных VHH, специфичных к BCMA [151].

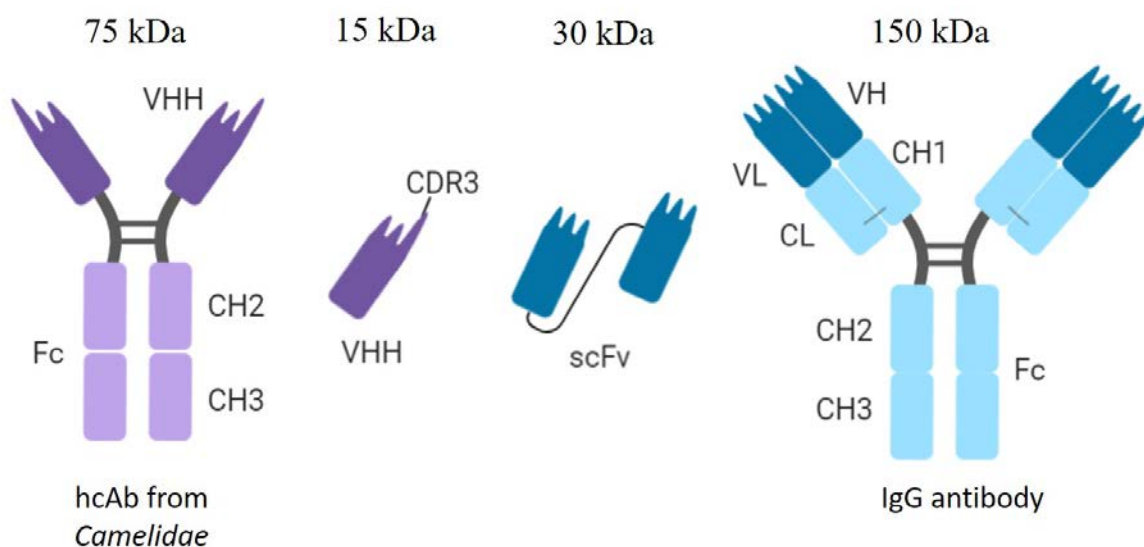


Рисунок 6. Структура классического IgG-антитела, scFv формата и однодоменных (hcAb) антител *Camelidae*.

Преимуществами таких однодоменных антител в качестве антигенраспознающих модулей CAR является высокая стабильность и отсутствие необходимости комбинирования двух переменных доменов (экспериментальное выяснение их оптимального порядка в сочетании с подбором длины и гибкости соединяющего их линкера), как в случае scFv. К недостаткам VHH можно отнести потенциальную иммуногенность и необходимость подтверждения специфичности связывания с антигеном для предотвращения “on-target off-tumor” активности [152,153]. На сегодняшний день данные по клиническому применению cilta-cel (имеющий в своей структуре VHH) являются крайне воодушевляющими в контексте терапии множественной миеломы [154].

Эффективность и удобство использования VHH вдохновили исследователей на создание полностью человеческих однодоменных антител и CAR на их основе [155–158]. Такой подход потенциально позволит увеличить безопасность применения и снизить иммуногенность, с другой стороны, для создания таких антигенраспознающих доменов необходимо вносить значительное количество изменений для увеличения стабильности структуры и снижения риска агрегации, что все равно увеличивает потенциальную иммуногенность белковых структур. Кроме того, эффективность применения подобных CAR в реальной клинической практике на данный момент не изучена [159].

Иллюстрацией того, насколько мощным и продуктивным может быть использование современных инструментов синтетической биологии, является создание CAR на основе d-доменов – полностью синтетических, *de novo* сконструированных белковых молекул (~70 а.о.),

состоящих из трех антипараллельных α -спиралей, соединённых короткими петлями. Как и V_HH, d-домены являются компактными, структурно простыми модулями, хорошо поддающимися инженерии, которые могут быть удобнее для построения мультиспецифичных CAR-конструкций, чем классические scFv. В частности, был найден d-домен, специфически узнающий BCMA – после его изменения, которое заключалось в деиммунизации и повышении аффинности, был получен CART-ddBCMA (anito-cel), который показал высокую эффективность в сочетании с отсутствием значимых токсичностей в клинических испытаниях на пациентах с множественной миеломой. В настоящее время эта программа уже перешла к регистрационной II фазе и рандомизированной III фазе испытаний [160,161].

В свою очередь, использование естественных лиганд-рецепторных пар [162–167] аналогично снижает риск возникновения иммунного ответа пациента на антигенраспознающий домен в структуре CAR, однако повышает риск уничтожения нормальных клеток и тканей, экспрессирующих данный лиганд/рецептор [168]. Такой подход осложнен несколькими проблемами. Во-первых, это относительно скромный выбор подходящих лиганд-рецепторных пар, экспрессия которых значима только на опухолевых клетках, что напрямую связано с вопросами эффективности и безопасности таких CAR T-клеток. Во-вторых, это вопрос фиксированной, эволюционно отобранной аффинности в такой паре, которая может сильно отличаться от оптимальной в составе CAR. Наконец, дизайн таких CAR может быть ничуть не проще и представлять собой отдельное сложное структурно-функциональное исследование. Так, первый опыт использования CAR, антигенраспознающая часть которого состоит из последовательностей белка APRIL, естественного лиганда белков BCMA и TACI [169], показал ограниченный клинический эффект, что привело к досрочному завершению клинического испытания (NCT03287804) [170] и потребовала полного ре-дизайна CAR [171], с учетом того обстоятельства, что APRIL взаимодействует со своими рецепторами в тримерном, а не мономерном виде. Соответственно, только использование такого, переработанного CAR T-клеточного продукта позволило достичь обнадеживающих уровней эффективности и безопасности у пациентов с множественной миеломой [172].

В этой связи стоит отметить, что клинические испытания двух разных дизайнов CAR T-клеток на основе НК-клеточного рецептора NKG2D, связывающегося с 8 лигандами на поверхности перерожденных клеток, показали достаточно низкую эффективность в клинических испытаниях у больных с острым миелоидным лейкозом/миелодиспластическим синдромом и множественной миеломой, что независимо указывает на определенные сложности в создании CAR на основе лиганд-рецепторных взаимодействий [165,166].

Альтернативным источником новых антигенраспознающих доменов является *de novo* создание белковых конструкций. DARPins – это класс искусственно сконструированных белков, способных высокоспецифично связывать молекулы-мишени и представляющих собой один из классов так называемых антитело-миметиков (antibody mimetics). Это достаточно гетерогенный класс белков, однако типичный DARPIn-домен включает обычно несколько внутренних анкирин-повторов (каждый ~33 аминокислоты) плюс N- и C-концевые “cap”-повторы, которые экранируют гидрофобное ядро и повышают стабильность. DARPins меньше по размеру, чем классические scFv, менее склонны к агрегации, более термодинамически стабильны и считаются менее иммуногенными по сравнению с мышиными scFv [173]. В доклинических исследованиях такие CAR, специфичные к HER2, показали сравнимый эффект в экспериментах *in vitro* [174] и преимущество на модели ксенотрансплантированной опухоли на *in vivo* модели по сравнению с “классическими” вариантами [175]. Кроме того, такие домены возможно успешно мультимеризовать: так, создание триспецифичного рецептора, распознающего одновременно EGFR, EpCAM и HER2, привело к синергетическому противоопухолевому эффекту в *in vitro* исследованиях [176].

Наконец, нельзя не упомянуть еще о трех, чуть более “экзотических” вариантах антигенраспознающих модулей, которые были опробованы в контексте CAR. Это варианты, основанные на пептидах, IgNAR акул [177] и аднектинах (Fn3-белках) [178,179]. Из нескольких форматов пептидных CAR прежде всего стоит выделить CAR, основанный на хлоротоксине (CLTX) из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus*. В данном случае исследователи опирались на уникальное свойство этого 36-амк пептида, а именно на его способность избирательно связываться с поверхностью глиомных клеток и клеток примитивных нейроэктодермальных опухолей [180]. Клиническое испытание внутриопухолевого/интракавитарного введения CLTX-CAR у пациентов с глиобластомой показало стабилизацию заболевания (с последующей прогрессией во всех случаях) в сочетании с отсутствием значимых токсичностей и иммуногенности [181]. В свою очередь, работа по созданию идиотип-специфичных CAR с использованием высокопроизводительного скрининга пептидов, распознающих уникальный для опухолевого клона В-клеток конкретного пациента с фолликулярной лимфомой идиотип (в составе В-клеточного рецептора), представляется многообещающей, однако этот подход пока не был доведен до клинических испытаний [182].

Отдельно стоит отметить крайне интересный формат CAR, известный как SUPRA CAR (zipCAR): в качестве антигенраспознающего модуля в них используется 50-амк BZip(RR)-домен, составляющий одну из половинок так называемого лейцинового zipper – а соответствующая ему вторая половинка соединена с scFv, узнающим целевой эпитоп на поверхности опухолевой

клетки, тем самым формируя адапторную молекулу zipFv. Высокоаффинное взаимодействие таких BZip/zipFv позволяет легко контролировать специфичность и активность zipCAR T-клеток путем введения новых или дополнительных zipFv или путем их удаления [183]. Как и в предыдущем примере, данные о клиническом тестировании платформы zipCAR пока отсутствуют.

1.4.2. Шарнирный домен CAR

Шарнирный домен в составе CAR прежде всего необходим для того, чтобы антигенраспознающий домен был корректно позиционирован относительно узнаваемого им эпитопа (рис. 7) [184,185]. Несмотря на то, что эксперименты с использованием различных шарнирных доменов установили, что CAR с более короткими шарнирными доменами в среднем работают лучше за счет поддержания более плотного иммунного синапса [186] и физического исключения из него фосфатазы CD45, а более длинные шарнирные домены могут обеспечивать большую доступность для CAR мембран-проксимальных эпитопов [187–189], влияние длины и природы шарнирного домена на функциональность CAR T-клеток продолжает оставаться областью проб и ошибок.

На практике выбор шарнирного района зависит от расположения узнаваемого CAR эпитопа на поверхности клетки-мишени и размера целевого белка [190,191], поскольку при ее взаимодействии с CAR T-клеткой формируется аналог иммунологического синапса, имеющего строгие ограничения по размеру (~ 15-20 нм). Несмотря на то, что существует ряд ключевых отличий CAR T-синапса от классического иммунологического синапса [192], было показано, что за счет оптимизации длины шарнирного района CAR в соответствии с расположением узнаваемого эпитопа относительно мембраны клетки-мишени можно достигать целевой ширины межклеточного CAR T-синапса (~15 нм) [193] и увеличивать чувствительность CAR T-клеток в отношении клеток мишеней со сниженным уровнем экспрессии антигена [194]. Кроме того, было показано, что даже при формировании более широкого, чем 15-нм, CAR T-синапса в ряде случаев можно достигнуть высокой чувствительности и функциональности CAR T-клеток за счет "подгонки" длины адгезионного комплекса CD2/CD58 с одновременным снижением регуляторного вклада ко-ингибирующей пары PD-1/PD-L1 [195].

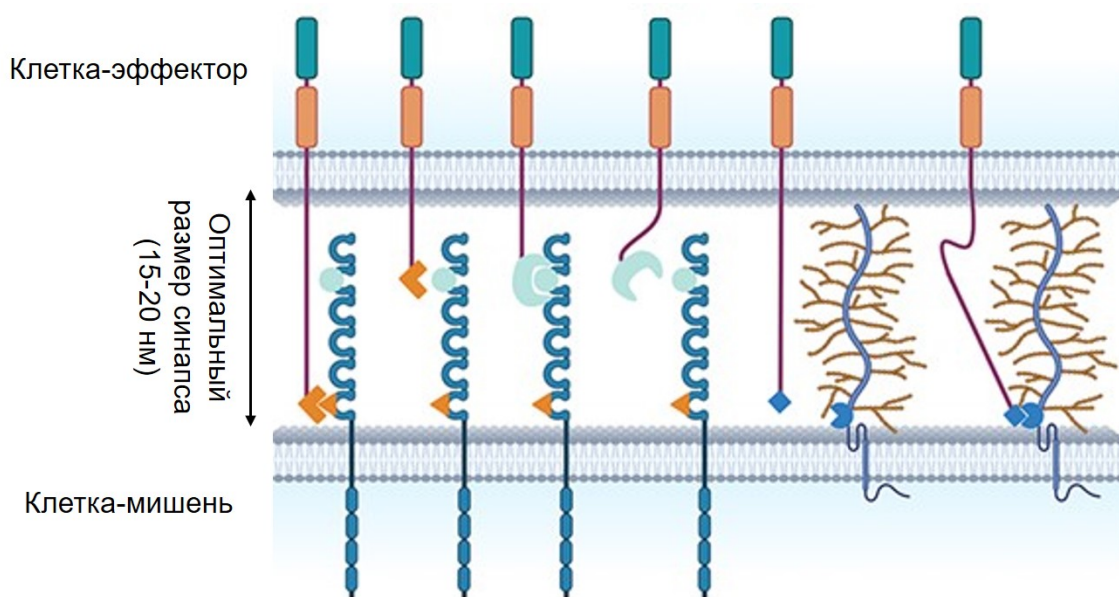


Рисунок 7. Схематичное изображение влияния длины и гибкости шарнирного домена на активацию клеток-эффекторов (сверху) в зависимости от положения распознаваемого эпитопа на белках клетки-мишени (снизу) (с изменениями из [190]).

Исторически сложилось, что в качестве шарнирного района чаще всего используются последовательности CD8a, CD28 и IgG1/IgG4 (hinge-Fc часть) (рис. 5) [187,196]. Скорее всего, данный выбор был обусловлен тем, что эти последовательности хорошо изучены, для них есть данные структурного анализа и они обладают достаточной гибкостью. Однако позже выяснилось, что не для всех scFv-CAR работает «короткий» CD8a-шарнир, а Fc-часть IgG не инертна биологически. Так, при переходе к испытаниям на мышинных моделях было обнаружено, что происходило взаимное узнавание клеток с IgG-содержащими CAR и FcγR+ клеток: моноцитов, макрофагов и NK-клеток. Это приводило к тому, что CAR T-клетки неспецифически возбуждались в отсутствие антигена и проявляли цитотоксичность по отношению к FcγR-экспрессирующим клеткам, которые, в свою очередь, активировались и уничтожали CAR T-клетки [188,197,198].

Считается, что склонность к гомо- или гетеродимеризации шарнирных районов помогает CAR более эффективно удерживаться на поверхности клетки [199]. Хотя, крупных систематических исследований по сравнению функциональности димеризующихся и недимеризующихся CAR пока не было проведено, есть данные о существенном влиянии как шарнирного района [200], так и мультимеризации на эффективность CAR T-терапии [201].

Относительно недавно был создан CAR с шарнирным районом из последовательности NGFR/p75, который не только не узнается клетками иммунной системы, но и не димеризуется [202]). Возможно, это упростит детекцию CAR на поверхности клеток, позволит при

необходимости провести дополнительную селекцию, а также легко уничтожить их в организме пациента, используя NGFR-специфические моноклональные антитела.

1.4.3. Трансмембранный домен CAR

Основная функция трансмембранного района заключается в закреплении CAR на поверхности клетки, поэтому для этой цели чаще всего используют последовательности CD8 α [203], CD28 [204], 41BB, CD3 ζ [205–207], TNFRSF19 [208] и реже из CD4 [185,209], CD7 [185], ICOS [210]; CD27 [162]; OX40 [204], MHC(H2-Kb) [211], NKG2D [212,213] и KIR [214] (рис. 5). Выбор конкретного варианта зачастую определяется тем, какие шарнирные или сигнальные последовательности располагаются рядом [215].

Хотя вклад трансмембранного домена не оценивался систематически в ранних работах, появляется все больше данных, что такое влияние недооценено, как и в случае с шарнирными доменами. Так, недавно было показано, что трансмембранный домен CAR на основе белка CD28 взаимодействует с нативным CD28, что в свою очередь сказывается на активности CAR Т-клеток. [216]. Кроме того, сообщалось об увеличенной функциональности CAR Т-клеток в отношении ксенотрансплантированной солидной опухоли за счет комбинации склонного к димеризации шарнирного района IgG4 и трансмембранного домена CD28 [217].

Наконец, стоит отметить, что развитие методов *de novo* предсказания и создания новых вариантов трансмембранных доменов должно помочь создавать CAR и проводить *in silico* настройку их активности для фундаментальной или прикладной синтетической биологии [218] в ближайшее время.

1.4.4. Сигнальный домен CAR

Активация Т-клетки – ключевое событие, определяющее программу дифференцировки, фенотип, функциональность и долговечность зрелых Т-клеток. В естественных условиях этот процесс запускается антиген-презентирующими клетками, передающими Т-клеткам три сигнала, причем происходит это в строго скоординированных пространственно-временных паттернах, а именно через стимуляцию Т-клеточного рецептора (TCR) (сигнал 1), костимуляцию (сигнал 2) и паракринный цитокиновый сигналинг (сигнал 3). Сила и длительность этих сигналов влияют на транскрипционные и эпигенетические изменения внутри Т-клеток, которые в конечном итоге определяют направление пролиферации Т-клеток, дифференцировку клеток памяти и эффекторную активность.

Функция сигнального домена CAR – активировать Т-клетку после распознавания клетки-мишени за счет внеклеточной части CAR. Использование последовательностей CD3 ζ в качестве сигнального домена CAR позволяет имитировать начало стандартного активационного каскада от TCR и может приводить к уничтожению клеток-мишеней и секреции ряда цитокинов (это так

называемые CAR «первого поколения» [219,220]. Однако при этом CAR Т-клетка чаще всего не получает необходимого для запуска пролиферативной программы дополнительного сигнала от костимулирующих рецепторов (поскольку их лиганды, как правило, отсутствуют на клетках-мишенях) [203,221]. В итоге, CAR первого поколения, содержащие только сигнальный домен CD3 ζ или Fc γ , продемонстрировали недостаточную персистенцию и ограниченную клиническую эффективность у онкологических больных [123,135,222,223]. Для решения этой проблемы было создано «второе поколение» CAR, содержащих не только участок CD3 ζ , но и сигнальную часть CD28, что обеспечивает клетку стимулирующим и костимулирующим сигналом. Таким образом, после получения сразу двух этих сигналов CAR Т-клетка не только активируется и уничтожает мишень, но и активно пролиферирует [224,225]. Помимо CD28 в качестве костимулирующих последовательностей в состав CAR также вводили внутриклеточные участки белков 4-1BB, MyD88, OX40, CD27, ICOS, 2B4 и других (рис. 5) [58,203,204,224,226–228]. Любопытно, что в этих экспериментах было выяснено, что принадлежность костимулирующих последовательностей к TNFRSF-семейству или к IgSF-семейству, т.е. их природа оказывала непосредственное влияние на динамику и характер активности CAR Т-клеток [58,229], позволяя репрограммировать CAR Т-клетки в направлении основных функциональных подтипов (Th1, Th17, Th2 и т.д.) [230] и задавая определенное состояние их метаболизма (гликолиз (CD28) или сдвиг в сторону усиленного окисления жирных кислот и митохондриального биогенеза (4-1BB)) [231]. После этого было создано и «третье поколение» CAR, содержащих несколько костимулирующих последовательностей: например, 4-1BB-CD28-CD3 ζ . Такой дизайн внутриклеточных последовательностей CAR не только вызывает секрецию более широкого набора цитокинов CAR Т-клетками, но и обеспечивает более эффективное уничтожение опухолей в мышинных моделях [232,233]. Данных о результатах применения в клинике CAR третьего поколения пока недостаточно, чтобы уверенно судить об их большей или меньшей эффективности [234] или токсичности [235]. Самым частым вариантом используемых сигнальных последовательностей остается второе поколение рецепторов: это комбинации CD28-CD3 ζ либо 4-1BB-CD3 ζ [236,237]. Сочетание CD28-CD3 ζ приводит к “взрывной” экспансии модифицированных Т-клеток *in vivo* [231], однако оно же значительно ускоряет истощение CAR Т-клеток, что может в итоге снижать эффективность терапии [60,141]. В отличие от CD28, 4-1BB-домен вызывает более плавную пролиферацию клеток, более длительное поддержание в организме и более медленное истощение клеток-эффекторов [229].

Тем не менее, на данный момент невозможно предсказать функциональность и потенциальные побочные эффекты (такие как тонический сигналинг, “on-target off-tumor” эффект), основываясь только на аминокислотной последовательности CAR и выбор

оптимального состава рецептора основывается на тестировании панели различных вариантов в тестах *in vitro* и *in vivo*.

При активировании Т-клеток реализуется множество сигнальных путей, приводящих к индукции и/или подавлению экспрессии генов [238]. При этом регуляция клеточной активации не сводится только к работе сигнальных каскадов: существенный вклад в нее вносят альтернативный сплайсинг [239,240], контроль стабильности и скорости деградации отдельных мРНК [241,242], а также посттрансляционные механизмы [243]. Хотя сигнальные пути, связанные с активацией в Т-, В- и NK-клетках в целом гомологичны и сосредоточены вокруг активности транскрипционных факторов NF κ B, NFAT, AP-1 и киназы ERK [244–246], итоговые транскрипционные программы в этих клетках различаются. Вероятно, это определяется множеством факторов, начиная от существующей специфической для типа клеток организации хроматина и заканчивая различиями в субъединичном составе задействованных транскрипционных факторов. Интересно, что многие аспекты активации NK-клеток до сих пор остаются малоизученными, учитывая их крайнюю фенотипическую гетерогенность [247,248]. Соответственно, если для CAR Т-клеток механизмы активации аналогичны запуску TCR-опосредованных сигнальных каскадов [249], то для CAR NK-клеток (см. раздел 1.6) механизмы реализации CAR-опосредованной активации и цитотоксичности охарактеризованы существенно хуже [250,251]. Попытки адаптации дизайнов CAR, основанных на Т-клеточном сигналинге (CD28-CD3 ζ , 41BB-CD3 ζ , CD28-41BB-CD3 ζ), для использования в контексте NK-клеток или NK-клеточных линий были достаточно успешны [252–256], однако включение трансмембранных и/или костимулирующих элементов, заимствованных из рецепторов NK-клеток, таких как NKG2D/DAP10, DNAM-1, 2B4 или DAP12 позволило более гармонично согласовать CAR-опосредованную активацию с физиологией NK-клеточного сигнального аппарата [257,258]. При этом последние данные, полученные в результате непредвзятых скринингов библиотек внутриклеточных модулей CAR в контексте первичных NK-клеток человека, свидетельствуют о том, что существуют конфигурации эндодоменов CAR, обеспечивающие еще более стойкую пролиферацию и персистенцию, а также цитотоксичность CAR NK-клеток в условиях ограниченной цитокиновой поддержки [259,260].

1.4.5. Дополнительные последовательности в CAR-кассете

Несмотря на то, что CAR “второго поколения” являются единственными одобренными к клиническому использованию структурными форматами и наиболее часто используемыми в клинических испытаниях, все больше внимания уделяется созданию “усиленных” рецепторов “четвертого поколения”, несущих в CAR-кассете дополнительные последовательности.

Активация Т-клетки – это тонко регулируемый процесс, в котором некоторые из сигнальных путей являются негативными, поскольку любая активация в конечном итоге должна быть остановлена и восстановлено гомеостатическое равновесие. Таким образом, удаление или снижение активности негативных регуляторов Т-клеточной активации является популярной стратегией получения более потентных CAR Т-клеток. Помимо стандартных способов, основанных на CRISPR/Cas9-нокаутировании генов (*PDCD1*, *Cblb*, *DGKα / DGKζ*, *SOCS1*, *PTPN2*) [261–265] и shRNA-опосредованном снижении уровня их транскриптов (*PDCD1*, *HDAC11*, *AKT3*) [75,266,267], недавно сообщалось об использовании так называемых PROTACs – синтетических молекулах, направляющих целевые белки на протеасомную деградацию [75]. Также помимо чекпоинт-рецепторов и классических негативных регуляторов сигналинга TCR в качестве мишеней для функционального «усиления» CAR Т-клеток всё активнее рассматриваются регуляторы метаболической адаптации, устойчивости к истощению и формирования memory/stem-like фенотипа, включая PGC-1α [268], DNAJC15 [269], NR4A1/2/3 [270], TCF1 [271], RUNX3 [272], IL10 [273] и представители семейства FOXO [274].

Отчасти необходимость "усиления" CAR продиктована тем, что в контексте нативного взаимодействия между Т-клеткой и клеткой-мишенью, Т-лимфоцит получает не два, а три сигнала [274]. Этот “сигнал 3”, в норме возникающий вследствие активации некоторых цитокиновых рецепторов и необходимый для выживания и размножения Т-клеток, отсутствует в CAR "второго поколения", что может приводить к их нефизиологической активации, недостаточной персистенции и субоптимальной активности, особенно в контексте солидных видов рака [275]. В качестве таких дополнительных последовательностей широко используются мембранные или секретируемые формы цитокинов и хемокинов, вызывающих активацию, пролиферацию и привлечение других клеток иммунной системы. К таким молекулам-"усилителям" относятся IL2, IL7 [178], IL12 [276], IL15 [277], IL18 [278,279], IL21 [280], IL9Ra [281], а также так называемые инвертированные цитокиновые рецепторы (ICR) [282,283] и химерные рецепторы-переключатели (chimeric switch receptors) PD1/CD28, PD1/41BB, CTLA4/CD28, CTLA4/41BB, TIM-3/CD28, TIGIT/CD28, TGFβ/IL7; TGFβ/IL2/15, IL4/IL2, IL4/IL7, IL4/IL15, GM-CSF/IL18 [284], Siglec-9/CD28/41BB [285], превращающие негативный сигналинг в позитивный и задействующие сигнальные пути, аналогичные тем, что активированы при получении “сигнала 3”. Кроме того, было показано, что ко-экспрессия 41BBL и CD80 вместе с CAR первого поколения позволяла обеспечить не только костимуляцию самих CAR Т-клеток, но и транс-костимуляцию соседних антиген-специфических Т-клеток в опухолях с низкой/отсутствующей экспрессией лигандов костимулирующих рецепторов [286]. Логическим продолжением этой работы стало создание CAR “четвертого поколения” с ко-экспрессией 41BBL

вместе со стандартным CAR на основе последовательностей CD28-CD3 ζ [287–289] и система ко-экспрессии OX40 вместе со стандартным CAR на основе последовательностей 4-1BBz [290]. Такие подходы потенциально могут увеличивать время персистенции CAR T-клеток в организме пациента, значительно снижать дозу производимых и вводимых CAR T-клеток, избегать необходимости предкондиционирования, увеличивать инфильтрацию опухолевых очагов T- и NK-клетками, меняя опухолевое микроокружение, и вовлекать в противоопухолевый ответ клетки иммунной системы, такие как макрофаги, тучные клетки и NK-клетки. Однако при постоянной экспрессии таких молекул стоит ожидать и развития более тяжелых побочных реакций и токсичностей [291]. Одним из решений данной проблемы может быть экспрессия дополнительных молекул только после активации CAR T-клетки за счет использования активационно-индуцируемых промоторов. Такой подход потенциально может помочь справиться с проблемой низкой эффективности CAR T-клеточной терапии у пациентов с солидными опухолями, поскольку дополнительная поддержка, например, цитокинами сможет помочь T-клеткам преодолеть иммуносупрессивное опухолевое микроокружение и в полной мере реализовать свой цитотоксический потенциал, а также снизить вероятность развития тяжелых осложнений и токсичностей.

1.5. Субпопуляционный состав CAR T-клеточных продуктов

Известно, что не все субпопуляции T-клеток способны долго пролиферировать, а их способность к возобновлению обратно пропорциональна степени их дифференцировки [292]. Также недавно было показано, что антиген-специфичные субпопуляции T-клеток памяти непосредственно способствуют фенотипической и функциональной дифференцировке наивных T-клеток, которые, как следствие, теряют противоопухолевый потенциал при переносе в живой организм [293]. Используя уровень экспрессии белков CD62L и CD45RA в качестве маркеров дифференцировки, можно выделить 4 основные субпопуляции T-лимфоцитов [294,295]: наивные T-клетки (T_{naive}), T-клетки центральной памяти (T_{CM}), T-клетки эффекторной памяти (T_{EM}) и терминально дифференцированные эффекторные T-клетки (T_{EMRA}) [296]. Наивные T-клетки являются наименее дифференцированными, теряя экспрессию CD45RA, но экспрессируя по-прежнему CD62L, они дифференцируются в T_{CM} [297]. После антигенной рестимуляции T_{CM} теряют экспрессию CD62L и дифференцируются в T_{EM} [297,298] и, наконец, в терминально дифференцированные эффекторные T-клетки, которые лишены CD62L и реэкспрессируют CD45RA [299]. Каждая субпопуляция T-клеток по-разному приживается и обладает своей функцией при адоптивном переносе [295,297,298,300]. Короткоживущие эффекторные T-клетки (T_{EMRA}) проявляют мощные эффекторные свойства *in vitro*, однако, по-видимому, менее привлекательны для иммунотерапии из-за их ограниченной пролиферации и приживания *in vivo*

[294,295,301–303]. Т_{СМ}, наоборот, лучше приживаются и дольше персистируют по сравнению с более дифференцированными подмножествами Т-клеток [292,294,295,297,298,300,304].

Первые клинические испытания CAR Т-клеточной терапии были сфокусированы на вопросах безопасности и эффективности. Изучая то, почему часть пациентов не отвечала на CAR Т-клеточную терапию, стало понятно, что при аутологическом формате CAR Т-терапии каждый пациент получал индивидуальный клеточный продукт с составом, в котором соотношение и фенотипы CD4 и CD8 Т-клеток варьировали в очень широком диапазоне. Частично это было связано с простотой использования устоявшегося протокола получения CAR Т, а именно выделением и активацией суммарного пула CD3-позитивных Т-клеток, а также с тем, что частоты CD4 и CD8 Т-клеток в периферической крови человека зависят от возраста, истории перенесенных заболеваний и интенсивности/состава химиотерапии. Такая гетерогенность CAR Т-клеточных продуктов сказывалась на эффективности терапии, соответственно остро встал вопрос о том, каков должен быть оптимальный субпопуляционный состав CAR Т-клеток. Было показано, что даже такая простая модификация, как использование CAR Т-клеточного препарата с фиксированным соотношением CD4/CD8 клеток, равным 1, является более эффективным подходом, чем применение CAR Т-клеток с неопределенным составом. При этом важный нюанс состоял в том, что наиболее сильный противоопухолевый ответ достигался при использовании CD8⁺ CAR Т-клеток с фенотипом Т_{СМ} в соотношении 1:1 с CD4 CAR Т-клетками из субпопуляции Т_N [305]. Эти данные послужили отправной точкой для проведения клинических испытаний CD19-специфического клеточного продукта с фиксированным соотношением CAR CD4/CAR CD8=1, который впоследствии получил одобрение и назван liso-cel [306].

С другой стороны, при попытке получения CD20-специфических CAR Т-клеток с соотношением CD4/CD8=1 был обнаружен эффект, что отдельно отсортированные и трансдуцированные CD8 Т-клетки оказались гипofункциональны, то есть для CD8 CAR Т-клеток важно присутствие и "помощь" CD4 CAR Т-клеток. Чтобы преодолеть эту проблему, было предложено вначале отсортировать CD4 и CD8 Т-клетки, смешивать их в фиксированном соотношении 7:3 и только после этого трансдуцировать – итоговое соотношение CAR CD4/CAR CD8-Т-клеток будет близко к 1. Полученные таким образом CAR Т-клетки демонстрировали более высокую экспансию, менее дифференцированный/менее дисфункциональный фенотип и лучшую противоопухолевую активность, чем те, в которых CAR CD4 и CAR CD8 были получены отдельно и введены в соотношении 1:1. Данный эффект объясняется тем, что CD8⁺ CAR Т-клетки взаимодействуют с CD4⁺ CAR Т-клетками посредством молекул CD40-CD40L или CD27-CD70, что в свою очередь обеспечивает взаимную костимуляцию и в сочетании с секретируемыми

CD4+T цитокинами, увеличивает степень экспансии CAR T-клеток *ex vivo* и формирование более функционального фенотипа [307].

1.6. Использование NK-клеток и NK-клеточных линий в качестве носителей для CAR

Несмотря на успех CAR T-клеточной терапии при ряде онкогематологических заболеваний [308] и ее обнадеживающие результаты при некоторых аутоиммунных заболеваниях [309], а также значительный потенциал в лечении солидных опухолей [310], данный подход по-прежнему имеет ряд серьезных ограничений. В первую очередь, такой аутологический клеточный продукт невозможно стандартизировать и его вариабельность от пациента к пациенту крайне высокая, так как стартовым материалом для производства служат собственные T-клетки пациента. Такие различия могут быть обусловлены как возрастом пациента, так и степенью его предлеченности, меж тем состояние T-клеток и их фенотипический состав являются ключевыми факторами, обеспечивающим эффективность терапии [311]. Еще одним ограничением является время производства, характеристики и транспортировки клеточного продукта, особенно при индустриальной модели производства. Кроме того, необходимость производства уникального продукта и проведения всех необходимых контролей качества производственных процессов и итогового продукта вносят значимый вклад в итоговую стоимость терапии, заметно снижая ее доступность пациентам [312].

Одним из решений данной проблемы является использование аллогенных CAR T-клеточных продуктов. Для этого чаще всего используют T-клетки здоровых доноров, модифицированные таким образом, что они не опосредуют иммунных реакций против тканей реципиента и в то же время экспрессируют на своей поверхности CAR. Более подробно такой подход описан в следующем разделе.

Альтернативой CAR T-клеткам является создание и использования CAR NK-клеток [313]. В отличие от T-клеток, NK-клетки не несут TCR, а экспрессируют большое разнообразие как активирующих, так и ингибирующих рецепторов [314]. К наиболее охарактеризованным активирующим рецепторам NK-клеток относят NKG2D, DNAM-1, а также NKp30, NKp44 и NKp46. Дополнительный вклад в активацию NK-клеток вносят CD16, опосредующий ADCC, и 2B4, который чаще рассматривают как ко-активирующий рецептор. Каноническими ингибирующими рецепторами NK-клеток являются KIR2DL1/2/3, KIR3DL1/2, CD94/NKG2A, TIGIT, CD96, PVRIG и некоторые другие [315]. Функциональный ответ NK-клетки реализуется в соответствии с балансом позитивных и негативных сигналов от таких рецепторов: отсутствие достаточного ингибирующего сигнала и одновременное наличие активирующих стимулов создают условия для реализации цитотоксичности по механизму “missing self” и/или

распознавания индуцированного стресса [316]. Наконец, известно, что циркулирующие CD56^{dim} NK-клетки характеризуются высоким содержанием перфорина и гранзимов и выраженной естественной цитотоксичностью, кроме того, они экспрессируют адгезионные молекулы, включая LFA-1 и Mac-1, что способствует эффективному формированию иммунологического синапса и делает их привлекательной платформой для клеточной терапии [317,318].

В то же время стоит отметить, что с NK-клетками технически сложнее работать: они более требовательны к условиям культивирования и хуже поддаются трансдукции, чем T-клетки [319]. В связи с этим, помимо первичных NK-клеток периферической и пуповинной крови, в качестве альтернативных платформ для получения CAR NK-клеток были предложены NK-клетки, дифференцированные из iPSC [258] и immortalized NK-клеточные линии человека, такие как NK-92 [320]. Как и первичные NK-клетки, они не несут TCR, зато способны быстро уничтожать опухолевые клетки, опираясь на баланс сигналов от альтернативной системы рецепторов и секретировать набор цитокинов, отличный от такового T-клеток, что может значительно снижать вероятность и тяжесть токсических реакций, таких как РТПХ, синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками и синдром выброса цитокинов [321,322]. В отличие от CAR NK-клеточных продуктов на основе первичных NK-клеток, получаемых от разных доноров, такие CAR NK-клеточные продукты гораздо более гомогенны, могут быть лучше охарактеризованы и стандартизованы. Кроме того, они легче поддаются генетической модификации (например, в них проще удалять гены, кодирующие ингибирующие рецепторы, и/или доставлять путем трансдукции или трансфекции другие дополнительные генетические модули) [323]. Наконец, даже такое, казалось бы, отрицательное свойство CAR NK-клеток, как ограниченная персистенция, можно рассматривать в качестве преимущества относительно CAR T-клеток, поскольку это открывает возможность множественного дозирования и комбинирования с циклами химиотерапии. Данные первой фазы клинических испытаний CAR NK-клеточных продуктов, полученных из iPSC, для пациентов с устойчивыми формами В-клеточных лимфом свидетельствуют не только об их безопасности, но и эффективности [324–327]. Аналогично, данные клинических испытаний 1/2 фазы CAR NK-клеток, полученных из пуповинной крови, у пациентов с неходжкинскими лимфомами и хроническим лимфолейкозом (NCT03056339, NCT05472558) [252,253,328] или острым миелоидным лейкозом (NCT05008575) [329], также свидетельствуют о безопасности и эффективности таких CAR NK-клеточных продуктов. В то же время, данные для большинства CAR NK-клеточных продуктов, основанных на линиях NK-92 и NK-92MI, свидетельствуют об их безопасности, но пока в значительной мере ограниченной активности [330–333].

1.7. Заключение: проблемы и перспективы развития CAR-платформы

Исторически сложилось, что первый и наиболее детально охарактеризованный формат CAR T-клеточной терапии был аутологичный: T-клетки выделяют у пациента, генетически модифицируют *ex vivo* и вводят снова ему же. Однако у такого формата существует ряд серьезных ограничений. Три основных – это крайне высокая стоимость (сопряженная с технической сложностью всех ее этапов, на данный момент стоимость одного цикла терапии составляет порядка 500000\$ [334]), необходимость проведения лимфодеплеции и то, что далеко не для всех пациентов после множественных курсов химиотерапии оказывается в принципе возможным получить достаточное количество "качественных" T-лимфоцитов, служащих стартовым материалом для полифункциональных и активных CAR T-клеток. Новым, крайне перспективным, вариантом аутологической CAR T-клеточной терапии, является способ, в котором кодирующие CAR последовательности напрямую доставляются в T-клетки пациентов *in situ* при помощи наночастиц/транспозон-транспозазных систем или вирусной трансдукции [183]. Несмотря на то, что и у этого подхода есть свои сложности, результаты первых клинических испытаний, причем как в контексте онкогематологических, так и аутоиммунных заболеваний, свидетельствуют о том, что этот подход, как минимум, эффективен, однако должно пройти больше времени, чтобы уверенно судить о его безопасности [335–337].

Помимо этого, продолжает оставаться актуальным переход к аллогенному формату CAR T-клеточной терапии. При таком подходе возможен забор T-клеток здорового донора и производства сразу нескольких клеточных продуктов, которые будут обладать лучшими характеристиками, поскольку стартовый материал от здоровых доноров не подвергался никаким терапиям и не находился в угнетенном состоянии в ходе болезни. Такой продукт можно заготавливать заранее, криоконсервировать и вводить по мере необходимости. Однако при аллогенной трансплантации немодифицированные T-клетки реализуют иммунную реакцию “трансплантат против хозяина” (РТПХ) – это крайне тяжелое состояние пациента, при котором чужеродные T-клетки уничтожают собственные ткани пациента. Для того, чтобы исключить такую опасность, предложено несколько решений, а именно:

- 1) создание «универсальных» CAR T-клеток, лишённых экспрессии HLA и TCR [338–341];
- 2) создание «универсальных» CAR T-клеток, лишённых экспрессии TCR и CD52 [342];
- 3) создание «универсальных» CAR T-клеток со сниженной экспрессией HLA (иногда в сочетании с TCR) за счет ко-экспрессии вирусных белков, таких как NEF (HIV-1) [343], BNLF2a (EBV) [344] и US11 (HCMV) [345–347];
- 4) использование вирус-специфических CAR T-клеток [348–350];

- 5) использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) для получения CAR T [348–351]. В данном случае необходимо отметить, что для клеточных продуктов, полученных таким способом, сохраняется риск присутствия остаточных недифференцированных клеток и формирования тератом, а сам процесс дифференцировки требует многоуровневого контроля качества конечного продукта [352]
- 6) использование CAR NK-клеток и NK-клеточных линий (см. раздел 1.6).

В первых двух случаях традиционно используются системы редактирования генома для нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и/или *TRBC2*, *b2m* или *CD52* при помощи TALEN-нуклеаз [353–355] или системы CRISPR-Cas9 [356]. Однако использование мультиплексной системы редактирования генома в сочетании с лентивирусной трансдукцией продолжает вызывать много опасений из-за возрастающего риска нецелевых генетических модификаций и хромосомных транслокаций, а также недостаточной предсказуемости персистенции и эффективности таких “редактированных” CAR T-клеток [357–359]. Соответственно, несколько компаний уже перешли к использованию молекулярных инструментов генного редактирования “следующего поколения”, таких как редакторы оснований (base editors), для целенаправленного внесения изменений в эти и другие гены [360,361], поскольку в данном случае не происходит разрывов ДНК и снижается риск генотоксичности.

Имеющиеся клинические данные свидетельствуют о том, что CAR T-клеточная терапия хорошо работает только для онкогематологических и ряда аутоиммунных заболеваний, а в контексте солидных раков успехи CAR-терапии куда более скромные [308,362,363]. Для решения этой задачи в литературе описаны экспериментальные подходы, позволяющие CAR T-клеткам активнее перемещаться к опухолям, лучше противостоять иммуносупрессивному опухолевому микроокружению (выживать в условиях гипоксии и т.д.) [364], привлекать резидентные клетки иммунной системы [365], секретировать более широкий спектр цитокинов [366–368] и т.д. Также активно исследуется возможность комбинирования CAR T-клеточной терапии с другими противораковыми подходами, например, лучевой терапией [369], химиотерапией [370,371], вакцинацией цельноклеточной вакциной [372], объединением с онколитическим вирусом [373,374], терапией моноклональными антителами и их производными [375–378], а также вместе с терапией низкомолекулярными ингибиторами [379–382].

Помимо этого, было доказано, что укорочение и оптимизация самих протоколов получения CAR T-клеток оказывает существенный эффект на результат терапии. Короткое культивирование *ex vivo* обычно ассоциировано с меньшей терминальной дифференцировкой и истощением T-клеток, более “молодым” фенотипом CAR T-продукта и, как следствие, более

длительной персистенцией и усиленной функциональностью после введения. Очевидно, что ускорение производства само по себе важно клинически, поскольку пациент быстрее получает терапию [383]. Многообещающими выглядят также исследования эффективности и безопасности локорегиональной доставки CAR T-клеток в случаях, когда системное введение сталкивается с проблемами слабого траффикинга и проникновения в опухоль или высокой токсичности: прежде всего в солидных опухолях и особенно в опухолях центральной нервной системы [384].

Несмотря на более чем 20-летнюю историю активного развития CAR-технологий, в данной области остро стоят два вопроса, а именно, является ли "классический", одноцепочечный формат CAR оптимальным и существуют ли CAR с другим модульным составом, обеспечивающим большую эффективность этого способа терапии. Забегая вперед, можно сказать, что по-видимому для каждого вида рака дизайн и модульный состав должны быть подобраны специально и не существует универсального формата CAR, работающего одинаково хорошо в разных контекстах. Также существуют данные, что использование разных CAR (например, с разным сигналингом) в CD4 и CD8 T-клетках может обеспечить большую эффективность терапии за счет синергичных эффектов CD4 CAR T-клеток и CD8 CAR T клеток [210].

Большинство ранних исследований, нацеленных на совершенствование дизайна CAR, полагались на перебор от нескольких штук до двух десятков комбинаций модулей. Однако комбинаторная и модульная природа CAR с самого начала идеально подходили под использование библиотечных форматов и различных вариантов скринингов, в том числе скринингов *in vivo* и в контексте альтернативных клеточных носителей [385–393]. Использование таких высокопроизводительных способов поиска комбинаций модулей в последние годы позволило создать CAR, которые проявляют себя лучше *in vitro* и, что особенно важно, *in vivo*, чем референсные CAR, получившее клиническое одобрение. Рациональный дизайн CAR, основывающийся исключительно на известных свойствах индивидуальных модулей, 3D-структурах и аминокислотных последовательностях, пока реализован в единичных исследованиях с применением больших языковых моделей и искусственного интеллекта [75,394].

Наконец, необходимо отметить, что с развитием новых методов геномной инженерии и синтетической биологии разными исследовательскими группами и компаниями было предложено несколько принципиально новых архитектурных решений рецепторов (SynNOTCH [395–397]), HIT [398], STAR [399,400], TRuC-T [401], ChTCR [402], TAC-T [403], SUPRA-CARs [183], Split-CAR [404,405], KIR-CAR [406], маскированные / условно активируемые CAR [407],

см. рисунок 8). Все они были успешно протестированы на мышинных моделях, в которых они не уступали или превосходили стандартные варианты CAR/rTCR.

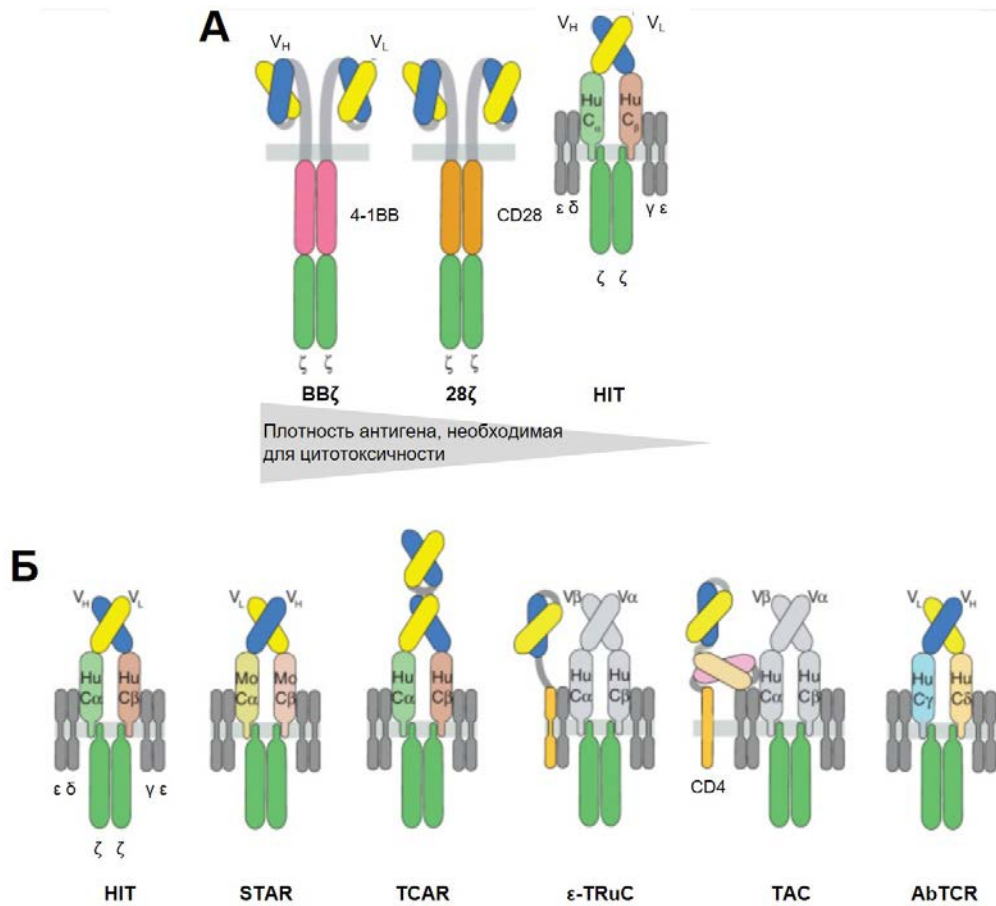


Рисунок 8. Схематичное изображение новых архитектурных решений для создания химерных рецепторов (с изменениями из [408]).

Тестирование лидирующих вариантов таких химерных рецепторов в пациентах в ближайшие годы должно показать, какие из них сочетают в себе оптимальный баланс эффективности, безопасности и доступности. При этом даже условно неудачные варианты являются информативными, поскольку они позволяют определить, в чем именно заключается проблема, и стимулируют дальнейшие исследования для ее преодоления. Кроме того, на сегодняшний день складывается убеждение, что разные задачи: тип заболевания, расположение и устойчивость опухолевых клеток в совокупности с генетическими маркерами, а также предшествующее лечение требуют разных CAR для достижения успешного терапевтического результата. В таком контексте, кроме создания новых рецепторов и проверки их в конкретных условиях, остается актуальным повышение предсказательной способности *in vitro* и *in vivo* тестирования вновь создаваемых рецепторов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе были использованы следующие реактивы и ферменты:

BigDye (AppliedBiosystems, США); EDTA (Gerbu, Германия); FastDigest green buffer (ThermoScientific, США); Yellow buffer (СибЭнзим, Россия); агар (Difco, США); агароза (Amresco, Германия); ампициллин (ОАО “Синтез”, Россия); АТФ (СибЭнзим, Россия); бромистый этидий (Serva, Германия); бромфеноловый синий (Sigma, США); глицерин (Serva, Германия); ДНК-лигаза фага Т4 (лаб. иммуногенетики ИМКБ СО РАН); ДНК-маркер 1 т.п.н. (СибЭнзим, Россия); дрожжевой экстракт (Difco, США); триптон (Organotechnie, Франция); полибрен (Sigma, США); пенициллин (ЗАО “Синтез”, Россия); стрептомицин (ЗАО “Синтез”, Россия); хлороформ (Panreac, Испания); хлорид натрия (Applichem, Германия); эндонуклеазы рестрикции (ThermoFisher Scientific, США); Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, США); Таq ДНК полимеразы (лаб. иммуногенетики ИМКБ СО РАН); витальный краситель 7AAD (Sigma, США); среда IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США); среда ТехMACS (Miltenyi Biotec, Германия); культуральная добавка Gluta-MAX (ThermoFisher Scientific, США); культуральная добавка Pyruvat (ThermoFisher Scientific, США); эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, ThermoFisher Scientific, США); Cell Proliferation Dye eFluor 670 (ThermoFisher Scientific, США), IL2 (Miltenyi Biotec, Германия), IL15 (Miltenyi Biotec, Германия); Белок L (Биоспецифика, Россия), стрептавидин PE, APC, APC-Cy7 (BioLegend, США), флуоресцентно-меченые антитела представлены в Таблице 3.

Все соли, кислоты и спирты были квалификации ХЧ или ОСЧ.

Коммерческие наборы: набор для выделения плазмидной ДНК, набор для элюции ДНК из агарозного геля (Биосилика, Россия); Gen Elute Plasmid Miniprep Kit (Sigma, США).

Таблица 3. Используемые в работе антитела

Антиген	Флуорохром/метка	Клон	Производитель
1. CD3	AlexaFluor 488	Н1Т3	BioLegend
2. CD3	FITC	ОКТ3	Сорбент
3. CD4	FITC	LT4	Сорбент
4. CD8	APC-Firc0	Н1Т8a	BioLegend

5. CD20	FITC	LT20	Сорбент
6. CD45RA	PE	HI100	BioLegend
7. CD62L	PE-Cy7	DREG-56	BioLegend
8. CD69	биотинилированные	FN50	BioLegend
9. LAG3	PE	11C3C65	BioLegend
10. NGFR	биотинилированные	ME20.4	BioLegend
11. PD-1	PE-Cy7	EH12.2H7	BioLegend
12. TIM3	APC	F38-2E2	BioLegend
13. c-мус	немеченые	9E10	Биоспецифика
14. Mouse IgG (H+L)	PE	поликлональные	ThermoFisher Scientific

2.1.2. Оборудование и программное обеспечение

В работе было использовано следующее оборудование:

Амплификатор T100 ThermalCycler (Bio-Rad, США); амплификатор MastercyclerClassic (Eppendorf, Германия); центрифуга 5418R с охлаждением (Eppendorf, Германия); центрифуга 5810R с охлаждением (Eppendorf, Германия); центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); микротермостат М-208 (БИС-Н, Россия); компактный персональный вортекс V-3 SkyLine (ELMI, Латвия); спектрофотометр Nanodrop 2000с (ThermoScientific, США); электрофоретическая камера Vari-Gel SystemUnit (ThermoScientific, США); UV-трансиллюминатор (Ю Rodeo, США); система документации гелей и блотов ChemiDoc (Bio-Rad, США); термостат TC-80M-2 (НИИМИ, Россия); мультипоратор (Eppendorf, Германия); инкубатор Binder BD 23 (Binder, Германия); автоклав Systec DB-23 (Systec, Германия); микробиологические ламинарные системы Modernclass 3 (Lamsystems, Россия); низкотемпературный и обычные холодильники для хранения образцов и реагентов; система очистки воды Arium pro (Sartorius, Германия); 8-капиллярный секвенатор 3500 LifeTechnologies (ThermoFisher Scientific, США); проточный цитофлуориметр BD FACSCantoII; проточный цитофлуориметр NovoCyte (Agilent, США); клеточный сортер Sony SH800 (Sony, Япония); планшетный люминометр Luminoskan™

Microplate Luminometer (Thermo Fisher Scientific, США), система прижизненной визуализации «IVIS Spectrum» (Perkin-Elmer, США).

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: QuantityOne v.4.6.7 (Bio-Rad, США); NanoDrop 2000c OperatingSoftware (ThermoFisher Scientific, США); Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США), Chromas v.2.4.3. (Technelysium, Австралия); FACSDiva (BD); FlowJo (De Novo Software); Living Image (Perkin-Elmer, США); GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, Inc).

2.1.3. Буферы и растворы

TAE: 40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА (pH 8,4);

10xGreen FD buffer: 10 mM Трис-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM ДТТ;

2xYellow buffer: 30 mM Трис-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 10 mM ДТТ;

Буфер нанесения для агарозного геля (5x): 0,5% бромфеноловый синий, 0,5% ксиленцианоловый, 50 % глицерин;

PBS: 1,7 mM KH₂PO₄, 5,2 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4;

2xHBS: 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂PO₄, 10 mM KCl, 12 mM сахараза, pH 7,12;

Flow Solution: PBS, 1,5% FCS, 0,06% NaN₃;

Для приготовления буферных растворов использовали воду, очищенную на установке arium®pro (Sartorius, Германия).

2.1.4. Олигонуклеотиды и плазмидные конструкции

В работе были использованы олигонуклеотиды (праймеры) производства Биоссет (Россия) (Таблица 4).

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в ПЦР и сиквенсной реакции.

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
EF1Fseq	tggagcctacctagactcagc
hingeR	agcacctgaactcctggg
CD3ζR	tgttttgacaagagacgtg

Плазмидные конструкции: 351, 353, 440, 182, pAndy, GAA, AAG1, AAG7 (получены в лаб. иммуногенетики ИМКБ СО РАН к.б.н. Горчаковым А.А.) были использованы для получения целевых плазмидных конструкций, кодирующих различные варианты CAR.

Паковочные плазмиды для проведения кальций-фосфатной трансфекции: pMD2.G и psPAX2 (Addgene, США).

2.1.5. Биологические материалы

В работе использовали устойчивый к стрептомицину штамм *E. coli* Stb13 (генотип *F– mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (StrR) xyl-5 λ– leu mtl-1*).

Эукариотические линии клеток НЕК293Т (эмбриональная эпителиальная линия клеток почки человека), линия клеток Jurkat (линия лейкоэмбриональных Т-лимфоцитов человека), линия клеток УТ (линия НК-клеточной лимфомы человека), линия клеток Nalm6 (В-клеточный острый лимфобластный лейкоз человека) и линия клеток Raji (лимфома Беркитта) были получены из Американской коллекции клеточных культур (АТСС, США). Линия НЕК293Т, экспрессирующая CD20 (НЕК293Т-CD20), была получена ранее в лаборатории.

Образцы первичных мононуклеаров крови были получены от здоровых доноров, давших письменное информированное согласие.

2.1.6. Питательные среды для выращивания *E. coli*

Среда LB: 10 г/л хлорида натрия, 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта. Среда LB-агар: 10 г/л хлорида натрия, 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 1,5% бактериального агара.

Компоненты для создания питательных сред LB и LB-агар смешивали и растворяли в дистиллированной воде, после чего автоклавировали. Среду LB хранили при +4 °С, среду LB-агар во избежание затвердевания хранили в термостате при +56 °С.

2.2 Методы

2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР-смесь включала в себя 10xAS-буфер (Биоспецифика, Россия): 650 мМ Tris-HCl (pH 8,9), 160 мМ (NH₄)₂SO₄, 15 мМ MgCl₂, 0,5% Tween 20, 2 мМ dNTP, по 10 мкМ каждого из праймеров, 10-50 нг ДНК-матрицы (плазмидная ДНК или суспензия клеток *E. coli*), 1 ед. ак. Taq-полимеразы (Биоспецифика, Россия). Реакции проводили в объеме 20 мкл. ДНК амплифицировали 33 цикла [94°C – 15 с, 50-56°C – 15 с и 72°C – x мин*], этап инициализации проводили 2,5 мин при 94°C, этап финальной элонгации – 2 мин при 72°C.

* Время элонгации выбиралось в зависимости от размера конечного продукта из расчета 1 мин /т.п.н.

2.2.2 Электрофорез в агарозном геле

Для анализа размера и качества плазмидной ДНК, продуктов гидролиза и ПЦР использовали 1% агарозный гель с бромистым этидием в буфере TAE: 40 мМ Trис, 0,02 М уксусная кислота, 1 мМ EDTA (pH 8,4). Для оценки длины ДНК-фрагмента использовали ДНК-маркер молекулярного веса – «1 kb» (Сибэнзим, Россия. Электрофорез проводили при напряжении 7 В/см.

2.2.3 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Для гидролиза использовали эндонуклеазы и буфер для рестрикции 10xFastDigest (FD, Thermo Fisher Scientific, США). Реакционная смесь в объеме 50 мкл смесь содержала 1-5 мкг ДНК, универсальный буфер для эндонуклеаз рестрикции Fermentas, Green FDbuffer: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 10 ед. ак. фермента. Реакционную смесь инкубировали 40 мин при 37 °С. После этого смесь наносили в карман 1% агарозного геля и при необходимости вырезали нужный фрагмент.

2.2.4. Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение проводили при помощи набора BioSilica (Россия) для выделения ДНК из агарозного геля согласно протоколу производителя. Фрагменты геля взвешивали и добавляли буфер М из расчета 300 мкл буфера на 100 мг геля. Полученную смесь инкубировали до полного растворения геля при 50 °С. Раствор наносили на микроколонку и центрифугировали 1 минуту при 20000 g. Фильтрат удаляли и микроколонку промывали дважды 700 мкл промывочного буфера W, после этого центрифугировали еще 2 минуты для полного удаления примесей промывочного буфера. Микроколонку переносили в новую пробирку и элюировали 50-100 мкл буфера E.

2.2.5. Лигирование ДНК

Лигазная смесь содержала 2xYellow buffer (30 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT), 50 нг ДНК вектора, 10-100 нг ДНК вставки, 10 мМ рАТФ, 5 ед. ак. T4 ДНК-лигазы (Биоспецифика, Россия) в 20 мкл. Лигирование проходило 12 часов при температуре 4 °С, после этого смесь пересаждали (см. п. 2.2.8).

2.2.6. Электротрансформация клеток *E. coli*

2.2.6.1. Приготовление электрокомпетентных клеток *E. coli*

Три мл ночной культуры клеток Stb13, выращенных в присутствии стрептомицина (50 мкг/мл) добавляли в двухлитровую колбу, содержащую 0,5 л LB, и инкубировали при температуре +25 °С до достижения культурой оптической плотности 0,4 на длине волны 600 нм (оптическую плотность измеряли при помощи настольного микроспектрофотометра NanoDrop2000). После этого колбу инкубировали во льду при покачивании в течение 30 мин. Клетки аликвотировали по 50 мл в охлажденные на льду фальконы и центрифугировали 10 мин при 4 °С, 3600 g. LB удаляли, к клеточному осадку добавляли охлажденную автоклавированную воду, суспендировали на льду и повторно центрифугировали. Промывки водой повторяли 3-4 раза, постепенно объединяя клетки до двух фальконов. Клетки переливали в 15 мл фалькон и промывали 10% глицерином, центрифугируя 15 мин при 4°С. Клеточную суспензию ресуспендировали в 3 мл 10% глицерина, аликвотировали по 50 мкл в 1,5 мл пробирки, сразу же замораживая их в жидком азоте. Полученные клетки хранили при -70 °С.

2.2.6.2. Электротрансформация плазмидной ДНК в электрокомпетентные клетки *E. coli*

Для трансформации лигазной смеси использовали 25 мкл компетентных клеток Stb13 и 1/10-1/5 часть лигазной смеси. В охлажденную на льду кювету вносили смесь клеток с лигазной смесью и проводили электротрансформацию при 1700 В, 5 мс. После этого к клеткам добавляли 1 мл среды LB, подогретой до +42 °С. Клеточную суспензию инкубировали 1 час при температуре +37 °С, затем производили рассев на агарные чашки с ампициллином (100 мкг/мл) и культивировали 12-15 часов. После этого проводили ПЦР-скрининг выросших колоний.

2.2.7. Выделение плазмидной ДНК

Выделение проводили набором BioSilica (Россия) для выделения плазмидной ДНК в соответствии с рекомендациями производителя с небольшими модификациями. 1,5 мл ночной культуры центрифугировали 1 минуту при 20000 g, супернатант удаляли. Осажденные клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера R, содержащего РНКазу А. Затем к суспензии добавляли 200 мкл лизирующего буфера L и перемешивали, при этом раствор становился прозрачным и вязким. После этого добавляли 200 мкл нейтрализующего буфера N и перемешивали до формирования

белого творожистого осадка. Образец центрифугировали 5 минут при 20000 g. Супернатант переносили на микроколонку и центрифугировали 1 минуту. Затем образец дважды промывали буфером W (700 мкл), центрифугируя по 1 минуте при 20000 g, и избавлялись от остатков буфера дополнительным центрифугированием в течение 2 мин при 20000 g. Колонку переносили в чистую пробирку и элюировали 100 мкл буфера E, подогретого до 50-60 °С.

2.2.8. Переосаждение ДНК

На один объем раствора ДНК брали 3 объема этилового спирта и 0,1 объема 3М NaOAc, рН 5,0. Если количество ДНК в растворе было небольшим, меньше 500 мкг, – добавляли гликоген (до конечной концентрации 0,1-1,0 мкг/мкл). Смесь инкубировали 40-60 минут при температуре -20 °С. Далее образец центрифугировали 10 минут при 20000 g и два раза промывали 500 мкл 70% этилового спирта. После этого образец промывали 300 мкл 96% этилового спирта и высушивали в термостате при +50 °С. Сухой осадок ДНК растворяли в автоклавированной воде.

2.2.9. Техники посева клеток *E. coli* на агаризованную среду

Перед работой металлические и стеклянные инструменты были стерилизованы прокаливанием в пламени спиртовки, а чашки Петри – УФ-излучением. В большую чашку Петри (D=15 см) заливали 25-30 мл агара, в маленькую (6 см) – 10-15 мл. В агар добавляли антибиотик в соответствии с резистентностью выращиваемых бактерий и их плазмид. В данной работе все плазмиды несли ген устойчивости к ампициллину, соответственно этот антибиотик вносили в жидкий агар до финальной концентрации 100 мкг/мл. Посев на поверхность агаризованной среды в чашках Петри производили с помощью бактериологической петли или микробиологического шпателя. При посеве петлей отбирали клетки *E. coli* из жидкой или замороженной культуры и на поверхности среды проводили истощающие штрихи. При посеве с использованием микробиологического шпателя на поверхность среды наносили необходимый объем жидкой культуры, затем, одновременно вращая чашку и проводя круговые движения стерильным шпателем, суспензию равномерно распределяли по поверхности среды. После этого чашке давали высохнуть, закрывали и помещали в термостат на +37 °С на ночь, дном вверх.

2.2.10. Сиквенсная реакция

Реакционная смесь содержала 50 нг ДНК, 3 мкл 5x BrightDye буфера (Thermo Fisher Scientific, США), 10 мкМ праймера, 0,4 мкл BrightDye (Thermo Fisher Scientific, США) и воду до финального объема – 15 мкл. Условия для проведения реакции секвенирования приведены в таблице 5.

Таблица 5. Условия проведения реакции секвенирования.

Шаг	Температура	Время	Количество циклов
Инициализация	96 °С	5 минут	1
Денатурация	96 °С	10 секунд	40
Отжиг праймеров	50-55 °С	10 секунд	
Элонгация	60 °С	4 минуты	
Сохранение	15 °С	∞	∞

После проведения сиквенсной реакции ДНК пересаждали следующим образом: к 15 мкл реакции добавляли 4 мкл 3М NaOAc с рН 5,0, 21 мкл воды и 60 мкл изопропанола. Образцы оставляли на 20 минут при комнатной температуре, осаждали центрифугированием на 20000 g в течение 20 мин, дважды промывали 80% этанолом при тех же параметрах центрифугирования, высушивали, и затем растворяли в 20 мкл раствора деинонизованного формамида «HiDi». Образцы наносили в лунки 96-луночного планшета, который затем загружали в автоматический 8-канальный секвенатор 3500 LifeTechnologies.

2.2.11. Культивирование клеточных линий человека

Клетки линий Jurkat, YT, NK-92, KHYG-1, Raji, Nalm6 и НЕК293Т культивировали в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 4 mM L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ЗАО “Синтез”, Россия) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Клетки пересаживали через день, либо за день до трансфекции разведением в 10-12 раз. Клеточную линию НЕК293Т рассаживали с применением диссоциирующего агента TrypLE (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Первичные Т-клетки культивировали в среде TechMACS (Miltenyi Biotec, Германия) с 50 ед./мл IL2, 7 нг/мл IL15, а также 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

2.2.12 Кримоконсервация клеточных линий

Для длительного хранения клеточные культуры криоконсервировали. Для этого клеточную суспензию (для адгезивных клеток первоначально их диссоциировали с поверхности культурального пластика реагентом TrypLE (Gibco, ThermoFisher Scientific, США)) осаждали центрифугированием 4 минуты с ускорением 400 g. Полученный супернатант удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 4 mM L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ЗАО “Синтез”, Россия), содержащей 10%

DMSO (MP biomedical, США), из расчета 10^6 клеток/мл. Полученную суспензию переносили в криоампулы и помещали на 24 часа в контейнер для заморозки CoolCell® Containers (Corning, США) при температуре -70 °C. По истечению 24 часов криоампулы перемещали в пары жидкого азота и хранили в нем нужное количество времени.

2.2.13. Разморозка клеточных линий

Для разморозки клеточных линий после хранения в парах жидкого азота криоампулы оттаивали, переносили содержимое в пробирку, содержащую десятикратный объем замороженной суспензии теплой среды IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 4 mM L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ЗАО “Синтез”, Россия). Полученную суспензию осаждали центрифугированием 4 минуты с ускорением 400 g. Осадок клеток ресуспендировали в свежей среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 4 mM L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ЗАО “Синтез”, Россия) и высаживали на культуральный пластик. В дальнейшем клетки переносили в инкубатор и культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C.

2.2.14. Получение целевых линий клеток при помощи клеточной сортировки

Для получения моноклональных линий Nalm6-Nluc-copGFP с определенным уровнем экспрессии copGFP, моноклональных линий HEK293T-CD20 со сниженным относительно клеточной линии Raji уровнем экспрессии CD20 и 100% экспрессирующих CAR NK-клеточных линий использованы клеточный сортер Sony SH800 (Sony, Япония). Родительскую поликлональную клеточную суспензию отбирали из ростовой среды после чего сортировали клетки с заданным уровнем экспрессии copGFP (Nalm6-Nluc-copGFP), либо уровня экспрессии CD20 (окрашивая анти-CD20 антителами и выставяя параметры интенсивности экспрессии относительно окрашенной в таких же условиях клеточной линии Raji, со средним, низким и очень низким уровнем) по одной клетке в каждую лунку 96-луночного культурального планшета. Использовали режим сортировки Single Cell (3 drops), как наиболее подходящий для получения моноклонов. Для получения CAR NK-клеточных линий родительскую поликлональную клеточную суспензию окрашивали антителами, связывающими эпитоп с-тус, присутствующий в структуре CAR, с последующей детекцией при помощи поликлональных антител, специфичных к мышинным IgG (H+L), конъюгированных с PE, после чего CAR⁺ клетки сортировали в 6-луночный планшет с использованием режима Normal. После сортировки планшеты помещали в инкубатор и культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Выбранные моноклоны дополнительно характеризовали при помощи проточной цитофлуориметрии для

определения гомогенности и интенсивности флуоресценции. Для полученных поликлональных CAR NK-клеточных линий аналогично верифицировали уровень экспрессии CAR.

2.2.15. Сборка вирусных частиц, псевдотипированных VSV-G, и определение титра

Сборку лентивирусных вирусных частиц, псевдотипированных поверхностным белком G вируса везикулярного стоматита (VSV) проводили в клетках линии HEK293T, используя стандартный протокол кальций-фосфатной трансфекции. Для этого ДНК лентивирусной конструкции смешивали с ДНК вспомогательных плазмид pMD.2G и psPAX2 в молярном соотношении 4:3:1. К смеси ДНК всех трех плазмид добавляли CaCl_2 до финальной концентрации 25 мМ и воду до 250 мкл. После этого смесь постепенно добавляли к 250 мкл стерильного 2xHBS, интенсивно перемешивая его на вортексе. Получившийся раствор по каплям добавляли к клеткам, растущим на 6-сантиметровой чашке с уровнем конфлюэнтности 50%. Супернатант, содержащий лентивирусные частицы, собирали через 48 часов и фильтровали через 0,45 мкм PES-фильтр (Millipore, Sigma, США). Полученный вирусный препарат хранили при -70 °С. Для определения физического титра полученного препарата лентивирусных частиц проводили титровку на клетках линии HEK293T. Для этого клетки линии HEK293T высаживали в лунки 48-луночного планшета по 80000 клеток на лунку, после чего добавляли различное количество лентивирусного препарата, полибрен до финальной концентрации 8 мкг/мл и доводили объем до 200 мкл/лунку средой IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 4 мМ L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ЗАО “Синтез”, Россия). Полученный планшет центрифугировали 40 минут при 32 °С, 600 g. После этого клетки инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С. Оценку эффективности трансдукции проводили через 3 суток, окрашивая клетки соответствующими антителами. Титр рассчитывали по точкам, где эффективность трансдукции была ниже 30% по формуле: количество лентивирусных частиц/мкл = (% трансдуцированных клеток × 80000)/(100 × добавленный объем препарата лентивирусных частиц).

2.2.16. Выделение первичных Т-клеток от здорового донора

Для получения первичных Т-клеток здорового донора в первую очередь выделялась субпопуляция первичных мононуклеарных клеток из периферической крови. Выделенную кровь разбавляли в 2 раза PBS с 1 мМ EDTA и наслаивали на фиколл (ПанЭко, Россия), в соотношении 3:2 по объему. Образец центрифугировали в течение 30 минут с ускорением 600 g при комнатной температуре. Фракцию мононуклеарных клеток 2 раза отмывали PBS с 1 мМ EDTA, центрифугируя 5 минут с ускорением 500 g. После чего Т-клетки выделяли по протоколу производителя (Dynabeads™ Untouched™ Human T Cells Kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific,

США). Мононуклеарные клетки считали на автоматическом счетчике клеток Luna II (LogosBio, Южная Корея) и добавляли 100 мкл Antibody Mix, 100 мкл 20% человеческого альбумина на каждые 10^7 клеток. Клетки инкубировали 30 минут в темноте при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и отмывали от антител добавлением 4 мл Isolation Buffer, центрифугируя 8 минут при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, с ускорением 350 g. Добавляли Depletion Beads из расчета 100 мкл на каждые 10^7 клеток. Инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Добавляли 4 мл Isolation Buffer и помещали пробирку на магнит. После того как все магнитные частицы сели на магнит – отбирали супернатант, содержащие интактные Т-клетки. Полученные Т-клетки два раза отмывали культуральной средой и высаживали в 6-луночный планшет (TPP, Швейцария) с концентрацией $10^6/\text{мл}$.

2.2.17 Активация Т-клеток

Для активации Т-клеток использовали Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Выделенные Т-клетки считали на автоматическом счетчике клеток Luna II (LogosBio, Южная Корея) и добавляли предварительно отмытые средой для Т-клеток магнитные частицы из расчета 25 мкл на каждые 10^6 Т-клеток. Коинкубацию с частицами проводили два дня, после чего клетки суспендировали и производили удаление частиц при помощи магнита, а Т-клетки использовали для трансдукции.

2.2.18. Трансдукция первичных Т-клеток человека

Трансдукцию проводили методом спинокуляции с $\text{MOI} = 3$ в присутствии 10 мкг/мл протамин сульфата (ЗАО “Синтез”, Россия). Для этого в лунки 48-луночного планшета переносили по 100 мкл тщательно суспендированных клеток. Одна из лунок оставалась контрольной, к ней не добавлялись вирусные частицы. К остальным лункам добавляли препарат лентивирусных частиц, рассчитывая его объем исходя из предварительно проведенной титровки, так, чтобы соотношение количество лентивирусных частиц:количество Т-клеток (MOI) было равно 3. После этого в каждую лунку добавляли протамин сульфат, и планшет центрифугировали 40 минут при $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, 600 g. После этого клетки инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Оценку эффективности трансфекции проводили, окрашивая антителами через 3 суток после проведения реакции.

2.2.19. Проточная цитофлуориметрия (FACS)

Клетки в количестве $1-2 \times 10^5$ отбирали из кондиционной среды, в случае адгезивной клеточной культуры (НЕК293Т) их предварительно обрабатывали TrypLEExpress, после чего осаждали 4,5 минуты с ускорением 500 g, после этого 2 раза отмывали FlowSolution. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл FlowSolution, добавляли антитела или конъюгаты антител в

соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали 30 минут при температуре +4 °С. После этого еще 2 раза промывали FlowSolution, центрифугируя по 4,5 минуты с ускорением 500 g. Для оценки клеточной гибели использовали витальный краситель 7AAD с концентрацией 1 мкг/мкл. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII. Результаты оценивали с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD).

2.2.20. Активационный тест

CAR T-клетки инкубировали с клетками-мишенями в соотношении эффектор:мишень (E:T) 1:2 (30000 CAR T-клеток на 60000 клеток-мишеней) 4 часа, каждая точка в 200 мкл в лунке 96-луночного планшета (TPP, Швейцария) среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) без экзогенных цитокинов. Для определения уровня поверхностной экспрессии CD69 при помощи проточной цитометрии использовали комбинацию анти-CD69/стрептавидин (биотинилированные, клон FN50, BioLegend, США, стрептавидин-PE, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США) и анти-CD3 (клон HIT3, Alexa Fluor 488, BioLegend, США). Для исключения из анализа нежизнеспособных клеток использовали витальный краситель 7AAD (1 мкг/мкл). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII.

2.2.21. Тест на моментальную цитотоксичность

2.2.21.1. Мечение клеток

Необходимое количество клеток-мишеней центрифугировали 3 минуты при 500 g при комнатной температуре. После этого клетки 3 раза промывали 2 мл стерильного PBS. Клетки ресуспендировали в 1 мл стерильного PBS и добавляли к ним 1 мкл метки Cell Proliferation Dye eFluor 670 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США). Мечение проводили в течение 10 минут в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Далее реакцию мечения останавливали, добавляя 5 мл среды IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) и еще раз центрифугировали. Полученные таким образом меченые клетки ресуспендировали в 5 мл среды, переносили в 6-сантиметровую чашку Петри и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С.

2.2.21.2. Цитотоксический тест

CAR клетки смешивали с предварительно мечеными клетками-мишенями в различных соотношениях E:T: 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 и 10:1, оставляя в одной лунке клетки-мишени без эффекторов для контроля. Клетки коинкубировали 4 часа в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) без экзогенных цитокинов. После этого в каждую лунку добавляли витальный краситель 7AAD и измеряли процент погибших клеток-мишеней на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII.

Цитотоксическую активность (% мертвых клеток-мишеней) рассчитывали по формуле: $(1 - \text{количество живых клеток-мишеней} / \text{количество живых клеток-мишеней в отсутствие CAR T-клеток}) \times 100\%$.

2.2.22. Тест на повторяющуюся цитотоксичность

CAR T-клетки были смешаны с клетками-мишенями Nalm6-CD20⁺ в лунках 96-луночного планшета, в соотношении E:T 1:2 (25000 CAR T-клеток к 50000 Nalm6-CD20) в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) без экзогенных цитокинов в двух повторах для каждого донора. Подсчет соотношения CAR T-клеток к клеткам-мишеням определяли каждые 48 часов, используя проточную цитометрию. Затем к CAR T-клеткам добавляли новые клетки-мишени до восстановления исходного соотношения 1:2. Такая процедура проводилась 4 раза (рис. 9).

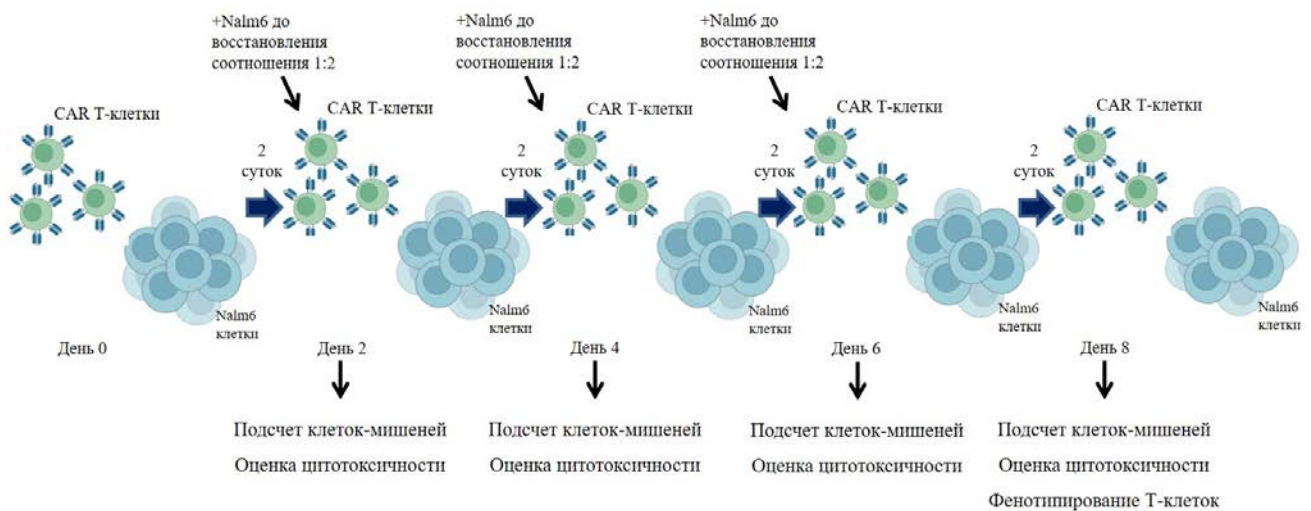


Рисунок 9. Схематичное изображение эксперимента по определению уровню повторяющейся цитотоксичности.

2.2.23. Анализ субпопуляционного состава CAR T-клеточных продуктов

Соотношение CD4/CD8 и субпопуляции T-клеток определяли при помощи проточной цитометрии. В первую очередь проводили гейтирование CAR⁺ T-клеток по экспрессии NGFR (биотинилированные, клон ME20.4, BioLegend, США, стрептавидин-APC, BioLegend, США). После этого выделяли CD4⁺ (FITC, clone LT4, Сорбент, Россия) и CD8⁺ (APC-Fire750, клон HIT8a, BioLegend, США). Субпопуляции наивных T-клеток (T_N, CD45RA⁺ CD62L⁺), T-клеток центральной памяти (T_{CM}, CD45RA⁻ CD62L⁺), T-клеток эффекторной памяти (T_{EM}, CD45RA⁻ CD62L⁻) и терминально дифференцированных T-клеток (T_{EMRA}, CD45RA⁺ CD62L⁻) выделяли по уровню экспрессии CD45RA (PE, клон HI100, BioLegend, США) и CD62L (PE-Cy7, клон DREG-56, BioLegend, США). Анализ субпопуляционного состава CAR T-клеточных продуктов после

теста на повторяющуюся цитотоксичность проводили аналогично, с изменением, что Т-клетки определяли по экспрессии CD3 (AlexaFluor488, клон HIT3, BioLegend, США), а CAR⁺ Т-клетки по экспрессии NGFR (биотинилированные, клон ME20.4, BioLegend, США, стрептавидин-APC, BioLegend, США). В дальнейшем, CD4-позитивные Т-клетки определяли по отсутствию экспрессии CD8 (APC-Fire750, клон HIT8a, BioLegend, США).

2.2.24. Анализ экспрессии маркеров Т-клеточного истощения среди CAR Т-клеточных продуктов после длительной стимуляции антигеном

CAR Т-клетки в финальную временную точку теста на повторяющуюся цитотоксичность были проанализированы с помощью проточной цитометрии. Популяцию CAR⁺ Т-клеток определяли по экспрессии CD3 (клон HIT3, Alexa Fluor 488, BioLegend, США) и NGFR (биотинилированные, клон ME20.4, BioLegend, США, стрептавидин-APC-Cy7, BioLegend, США). Среди CAR Т-клеток проводили анализ экспрессии PD-1 (PE/Cyanine7, клон EH12.2H7, BioLegend, США), TIM3 (APC, клон F38-2E2, BioLegend, США) и LAG3 (PE, клон 11C3C65, BioLegend, США).

2.2.25. Определение уровня секреции провоспалительных цитокинов IL2 и IFN γ после коинкубации CAR Т-клеток с клетками-мишенями при помощи иммуноферментного анализа

Для оценки уровня секреции IL2 и IFN γ CAR Т-клетки коинкубировали 12 часов с клетками-мишенями в соотношении E:T=1:2 в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) без экзогенных цитокинов. По завершении инкубации клетки осаждали центрифугированием 5 минут с ускорением 500 g, после чего супернатанты использовали для проведения иммуноферментного анализа согласно протоколу производителя (Вектор-Бэст, Россия).

2.2.26. Определение интенсивности люминесценции клеток *in vitro*

Для определения интенсивности люминесценции клеток линии Nalm6-Nluc-GFP использовали планшетный люминометр Luminoskan™ Microplate Luminometer (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки отбирали из ростовой среды, после чего два раза отмывали фосфатно-солевым буфером, центрифугируя 4 мин при комнатной температуре с ускорением 400 g. Затем подсчитывали клетки при помощи автоматического счетчика клеток Luna II (LogosBio, Южная Корея) и вносили в лунки 96-луночного планшета (SPL, Южная Корея) в диапазоне от 10 до 7290 клеток/50 мкл с трехкратным увеличением количества клеток в соседних лунках. Клетки лизировали добавлением равного объема буфера для лизиса (PBS, Triton-X до 0,1 %) в течение 10 минут с использованием орбитального шейкера при 700 оборотов/минуту. Для каждой точки

измерения выполняли в трех повторах. Субстраты разводили до финальной концентрации 30 мкМ в фосфатно-солевом буфере непосредственно перед началом измерения. Дозирование субстрата по 50 мкл/лунку производили автоматически. Таким образом, после смешивания с лизированными клетками финальная концентрация субстратов составляла 10 мкМ. Детекцию сигнала проводили немедленно после внесения субстрата в течение 0,5 секунд.

2.2.27. Методы работы с животными

Для оценки эффективности CAR T-клеток на модели ксенотрансплантированной опухоли были использованы самки мышей линии NSG (6-8 недель). В день 0 всем мышам ввели по 3×10^5 Nalm6-CD20 клеток-мишеней. CAR T-клетки вводили на 8 и 14 дни по 1×10^6 и 2×10^6 CAR T-клеток соответственно. Контрольная группа получила терапию T-клетками, несущими нерелевантный CAR, специфичный к PSMA. Мышей, показывающих признаки терминального состояния (паралич задних конечностей или признаки острой РТПХ), выраженных болевых синдромов, изменения поведения или высокой опухолевой нагрузки (по данным визуализации), выводили из эксперимента путем декапитации. После вывода животного из эксперимента образцы костного мозга (бедренная кость) и крови анализировали при помощи проточной цитометрии для подтверждения наличия или отсутствия опухолевых клеток в образцах.

Работа с животными и донорским материалом была одобрена локальным этическим комитетом, Протокол N31 от 28.12.2015 и Решение N002 от 09.09.2024.

2.2.28. Визуализация опухолевой нагрузки с использованием системы прижизненной визуализации «IVIS Spectrum»

Для визуализации ксенотрансплантированных опухолевых клеток мышам интраперитонеально вводили по 20 мкг h-целентеразина (Nanolight Technologies, США) в 100 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего через 5 минут животных наркотизировали при помощи изофлурана. Измерение люминесценции проводили в течение 180 с, используя систему прижизненной визуализации «IVIS Spectrum» (Perkin-Elmer, США). Полученные результаты съемки анализировали при помощи программного обеспечения Living Image (Perkin-Elmer, США).

2.2.29. Статистическая обработка данных

Статистический анализ был проведен при помощи программного обеспечения GraphPad Prism version 6, р-значение $<0,05$ считалось значимым. Обозначения на всех рисунках: ns – $p \geq 0,05$, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$. Для определения достоверности отличий в субпопуляционном составе, цитотоксичности, уровня активации и секреции цитокинов использовали метод двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с

использованием теста множественных сравнений Тьюки. Для сравнения кривых выживаемости использовали метода Каплана-Майера с последующим логарифмическим ранговым тестом (тест Мантеля-Кокса).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение конструкций для создания CD20-специфичных CAR с различными антигенраспознающими районами

Создание CAR, обеспечивающего эффективное перенаправление активности Т-клеток против опухолевых клеток-мишеней, неизменно проходит через этап получения панели кандидатных структурных вариантов и проведения отбора, основываясь на результатах нескольких стандартных тестов *in vitro* [409,410]. Так, зачастую, на итоговый результат и поведение CAR Т-клеток в тестах *in vitro* и *in vivo* влияет каждый модуль в составе такого рецептора. Это, в свою очередь, расширяет зоны влияния исследователям, когда, манипулируя доменным составом, можно произвести “тонкую настройку” CAR Т-клеточной терапии для конкретных целей, но с другой стороны затрудняет исследования, увеличивая количество неизвестных переменных.

Чтобы минимизировать возможное влияние других доменов в структуре CAR и сосредоточиться на влиянии антигенраспознающего домена, были использованы три различных варианта scFv, специфичных к CD20, полученные из мышиных моноклональных антител 1F5 и Leu16 и полностью человеческого моноклонального антитела 2F2 (офатумумаб) [83,125,411]. Последовательности, кодирующие данные scFv, были получены методом генного синтеза (Genewiz) и клонированы в лентивирусный вектор серии pCDH. Созданные таким образом плазмидные конструкции были идентичны друг другу за исключением последовательностей, кодирующих антигенраспознающий домен. В качестве шарнира и трансмембранного домена был выбран максимально короткий шарнирный район длиной 45 а.о., заимствованный от белка CD8 α , исходя из небольшого размера самого белка CD20. Было показано, что CAR Т-клетки с костимулирующими последовательностями, заимствованными от CD28, характеризуются “взрывным” пиком экспансии, и наблюдаются случаи раннего истощения таких клеток в сочетании с более высокой частотой развития осложнений, а для CAR Т-клеток с сигнальным районом от белка 4-1BB характерна более плавная экспансия и длительная персистенция в организме пациентов [412–414]. Опираясь на эти наблюдения, для создания CAR второго поколения в качестве костимулирующего модуля были выбраны последовательности 4-1BB в сочетании с классическими сигнальными последовательностями белка CD3 ζ , обеспечивающие активирующий Т-клетки “сигнал 1”. Для возможности дополнительной детекции встройки целевой кассеты в геном клеток был использован репортёрный ген, присоединенный через IRES-элемент и кодирующий лишенный цитоплазматических последовательностей укороченный вариант белка NGFR человека (рис. 10А). Такой репортер полностью биологически инертен,

однако позволяет уверенно судить о доставке целевой кассеты и непрямым способом оценивать процент CAR Т-клеток.

В качестве положительного контроля был воспроизведен CD19-специфический CAR на основе scFv от моноклонального антитела FMC63, идентичный используемому в коммерческом CAR Т-клеточном продукте tisa-cel (Novartis) [415–417], в качестве негативного нерелевантного контроля был получен PSMA-специфический CAR на основе scFv J591 (PSMA характерен для эпителиальных клеток простаты и клеток рака простаты, но отсутствует на поверхности В-клеток человека) (рис. 10А).

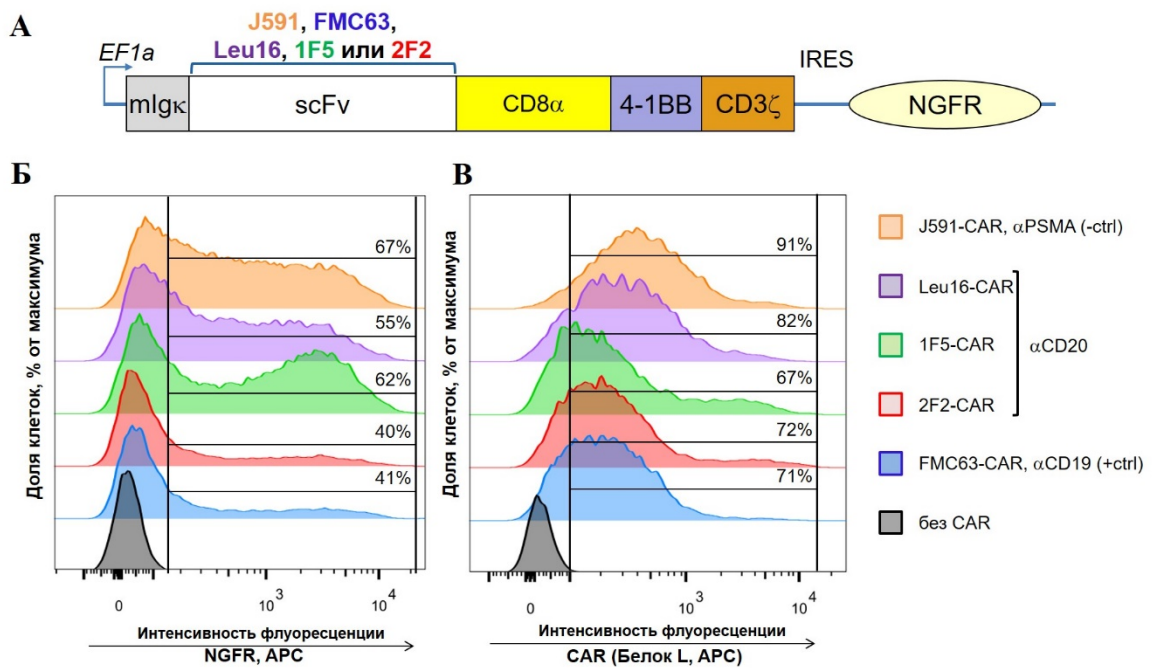


Рисунок 10. А – Модульная организация CAR, используемых в сравнении, Б, В – Использованный в работе протокол обеспечивает сравнимый уровень трансдукции первичных Т-клеток здорового донора и высокий уровень поверхностной экспрессии для всех тестируемых CAR, как следует из данных проточной цитометрии при детекции CAR с помощью антител к NGFR (Б) и конъюгированного с биотином белка L/APC (В) (приведены репрезентативные данные для одного из доноров).

3.2. Характеризация полученных CAR Т-клеток в тестах *in vitro*

3.2.1. Анализ поверхностной экспрессии CAR в контексте Т-клеток здоровых доноров

Для более корректного сравнения всех полученных рецепторов были выделены Т-клетки четырех здоровых доноров (медиана возраста 30 лет), после чего при помощи лентивирусной трансдукции в Т-клетки были доставлены кассеты, кодирующие CAR. Верификацию экспрессии проводили при помощи проточной цитометрии, окрашивая полученные CAR Т-клеточные продукты конъюгатами моноклональных антител против NGFR (репортёрный ген в CAR-

кассете) (рис. 10Б) и белком L, связывающим переменные последовательности легких цепей антител в составе scFv (рис. 10В). Используемые протоколы позволяют получать CAR Т-клеточные продукты с уровнем экспрессии целевого трансгена в пределах 40-70 %, что соответствует существующим требованиям к CAR Т-клеточным продуктам. Обобщенные данные по всем CAR Т-клеточным продуктам приведены в таблице 6. Все полученные продукты показывают схожие показатели по суммарной кратности экспансии и уровню трансдукции.

Таблица 6. Средние значения уровня трансдукции и кратности экспансии полученных CAR Т-клеточных продуктов здоровых доноров (n=4).

	Кратность экспансии	% CAR
1. FMC63-CAR	26,1±3,7	43±4%
2. 2F2-CAR	29,1±3,7	41±4%
3. 1F5-CAR	30,2±3,5	62±1%
4. Leu16-CAR	28,6±3,9	57±1%
5. J591-CAR (отр. контроль)	27,1±4,0	66±1%

3.2.2. Фенотипический анализ полученных CAR Т-клеточных продуктов

Важным контролем качества для CAR Т-клеточных продуктов является не только процент трансдукции Т-клеток, но и их субпопуляционный состав, так как существующие клинические данные показывают значимость влияния субпопуляционного состава на результаты терапии [418]. Крайне важно, чтобы присутствовали субпопуляции малодифференцированных Т-клеток: наивные Т-клетки и Т-клетки центральной памяти, так как именно эти субпопуляции способны к последующим многократным делениям и дифференцировке, а также имеют продолжительное время жизни. Наличие таких субпопуляций, по литературным данным, должно обеспечивать длительную персистенцию и, соответственно, долговременный противоопухолевый контроль [305,419–422]. Кроме присутствия малодифференцированных субпопуляций, внимание уделяется соотношению CD4:CD8 CAR Т-клеток. В части исследований показано, что соотношение ~1 демонстрирует наибольшую активность *in vivo* [6,306]. Так, для коммерческого

продукта liso-cel при технологическом процессе производства происходит сепарация отдельно $CD4^+$, отдельно $CD8^+$ Т-клеток, а последующие протоколы трансдукции и получения достаточного количества клеток производится параллельно, в итоге пациент получает 1:1 $CD4:CD8$ CAR Т-клеток [423].

Для проведения фенотипического анализа полученных CAR Т-клеточных продуктов были выделены 4 субпопуляции, используя окрашивание на 4 маркера ($CD4$, $CD8$, $CD45RA$, $CD62L$): терминально дифференцированные T_{EMRA} клетки ($CD45RA^+$, $CD62L^-$), Т клетки эффекторной памяти ($CD45RA^-$, $CD62L^-$), Т-клетки центральной памяти ($CD45RA^-$, $CD62L^+$) и наивные Т-клетки, включая стволовые Т-клетки памяти ($CD45RA^+$, $CD62L^+$) [424–426].

Все полученные CAR Т-клеточные продукты были фенотипированы на 3-й день после трансдукции с использованием нетрансдуцированных Т-клеток от тех же доноров в качестве контроля. Соотношение $CD4:CD8$ варьировало в диапазоне от 1,3 до 6,7 для различных доноров и это значение снижалось к 21-му дню (рис. 11).

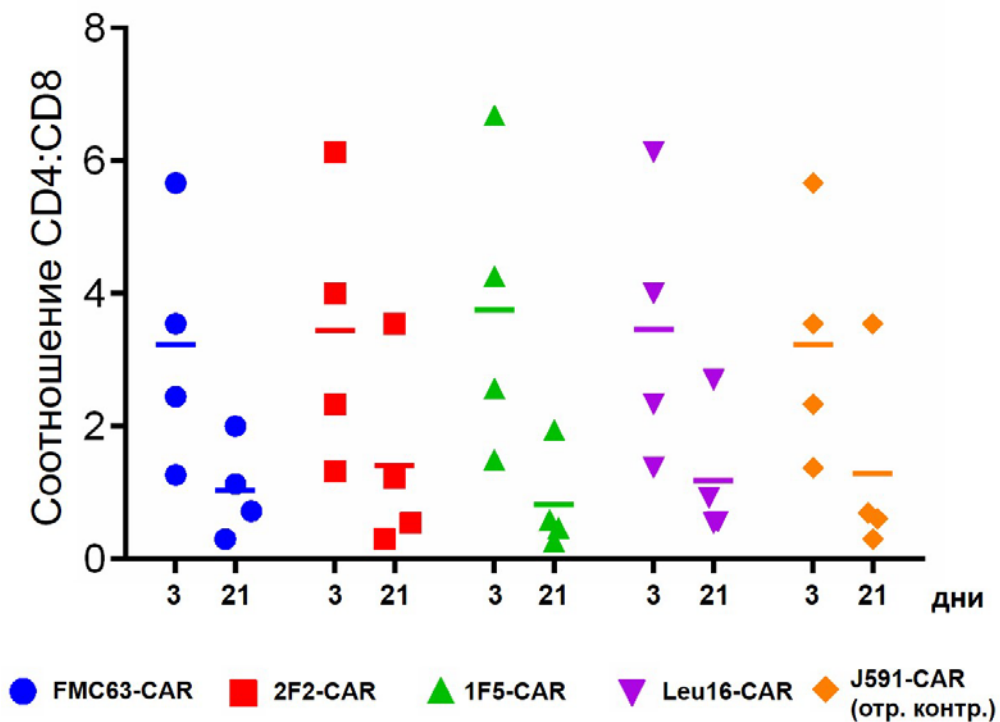


Рисунок 11. Соотношение $CD4:CD8$ в CAR Т-клеточных продуктах, оцененное на 3-й и 21-й день культивирования *ex vivo* для всех четырех доноров ($n=4$) (различия между временными точками статистически недостоверны).

Процент CAR^+ Т-клеток в клеточном продукте является одним из многих параметров, влияющих на эффективность и токсичность терапии, соответственно, возник вопрос, наблюдаются ли какие-либо изменения в субпопуляционном составе полученных CAR Т-клеточных продуктов. Для ответа на этот вопрос было решено исследовать динамику в

процентном содержании клеток T_N, T_{CM}, T_{EM} и T_{EMRA} на 3-й и 21-й день. Было проведено сравнение субпопуляционного состава отдельно для CD4 и CD8 CAR T-клеток и не было обнаружено существенных различий между ними (рис. 12а, б). В совокупности эти данные указывают на то, что scFv в составе CAR практически не влиял на фенотипический состав CD20-специфических CAR T-клеток, определенный во время стандартной процедуры культивирования *ex vivo*. В тоже время, длительное культивирование полученных CAR T-клеток *ex vivo* предсказуемо привело к изменению их субпопуляционного состава. В частности, увеличилась представленность T_{EM} и T_{CM} субпопуляций, а также CD8⁺ CAR T-клеток в целом. Такие изменения могут объясняться эффектами от добавления в культуральную среду цитокинов IL2 и IL15 и общей пролиферацией активированных T-клеток, при которой крайне сложно не вызвать изменения в субпопуляционном составе в стандартном, 12-дневном протоколе производства CAR T-клеток.

Чтобы узнать, как поведут себя CAR T-клетки в результате постоянного взаимодействия с клетками-мишенями и как изменятся их фенотипы, было проведено совместное культивирование CAR T-клеток с клетками-мишенями в течение восьми дней (тест на повторяющуюся цитотоксичность) и иммунофенотипирование таких клеток (было использовано 4 различных донорских клеточных продукта для каждого CAR в двух биологических повторах). В этих условиях наблюдались значительные изменения в субпопуляциях и увеличение процента клеток T_{CM} в продукте (рис. 12в). Примечательно, что во всех CD20-специфических CAR T-клеточных продуктах происходило обогащение T_{EM} клетками, в то время как FMC63-CAR продемонстрировал стойкое удержание высокого процента T_{CM} клеток.

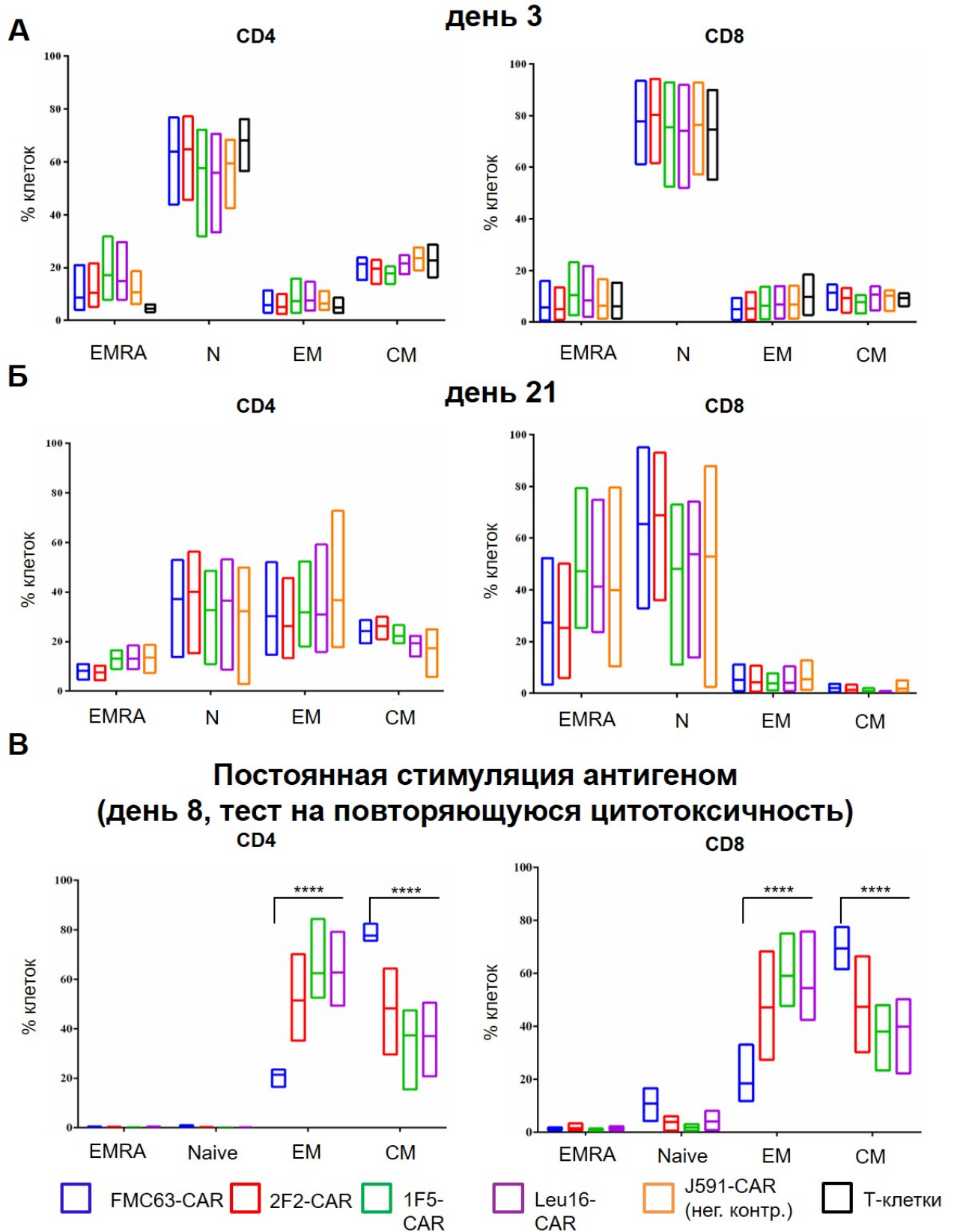


Рисунок 12. Представленность субпопуляций T_N , T_{CM} , T_{EM} и T_{EMRA} CAR T клеток среди $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток на 3 день (А) и на 21 день (Б) после выделения. В качестве контроля использовались немодифицированные T-клетки доноров сразу после выделения из периферической крови. На В показана представленность субпопуляций T_N , T_{CM} , T_{EM} и T_{EMRA} CAR T-клеток на 8 сутки теста на повторяющуюся цитотоксичность, **** – $p < 0,0001$.

Кроме присутствия целевых субпопуляций в клеточном продукте рутинно оценивается уровень экспрессии CAR Т-клетками маркеров истощения: PD-1, LAG3 и TIM3 [427,428]. Несмотря на то, что экспрессия PD-1 может служить маркером недавней активации Т-лимфоцитов [429], она тесно связана с отсутствием или снижением терапевтического эффекта [430,431]. Поскольку утверждать об истощенном состоянии CAR Т-клеток по экспрессии только одного маркера некорректно, общепринятым подходом для этого является измерение уровней поверхностной экспрессии нескольких маркеров истощения одновременно. Для всех полученных CAR Т-клеточных продуктов, находящихся в условиях постоянной стимуляции антигеном (кокультивация с клетками-мишенями, рисунок 9, раздел 2.2.22), была проведена оценка экспрессии трех маркеров истощения – PD-1, LAG3 и TIM3 среди CAR+ клеток при помощи проточной цитометрии. Хотя приблизительно 50% CAR Т-клеток были PD-1-положительными, все три маркера истощения одновременно обнаруживались менее чем у 20% CAR Т-клеток, несмотря на непрерывную стимуляцию клетками-мишенями и выращивание в отсутствие экзогенных цитокинов. В отличие от CD19- и CD20-специфичных CAR Т-клеток, PSMA-специфичные CAR Т-клетки (отрицательный контроль) демонстрировали почти фоновый уровень PD-1 и других маркеров истощения, что может объясняться отсутствием постоянных сигналов к активации после взаимодействия с клетками-мишенями. Значимых отличий по экспрессии маркеров истощения между CD20-специфическими и FMC63-CAR Т-клетками обнаружено не было (рис. 13). В совокупности полученные данные подтверждают существующее представление о том, что фенотипический состав клеточного продукта в большей степени обусловлен антиген-специфической и CAR-опосредованной стимуляцией CAR Т-клеток.

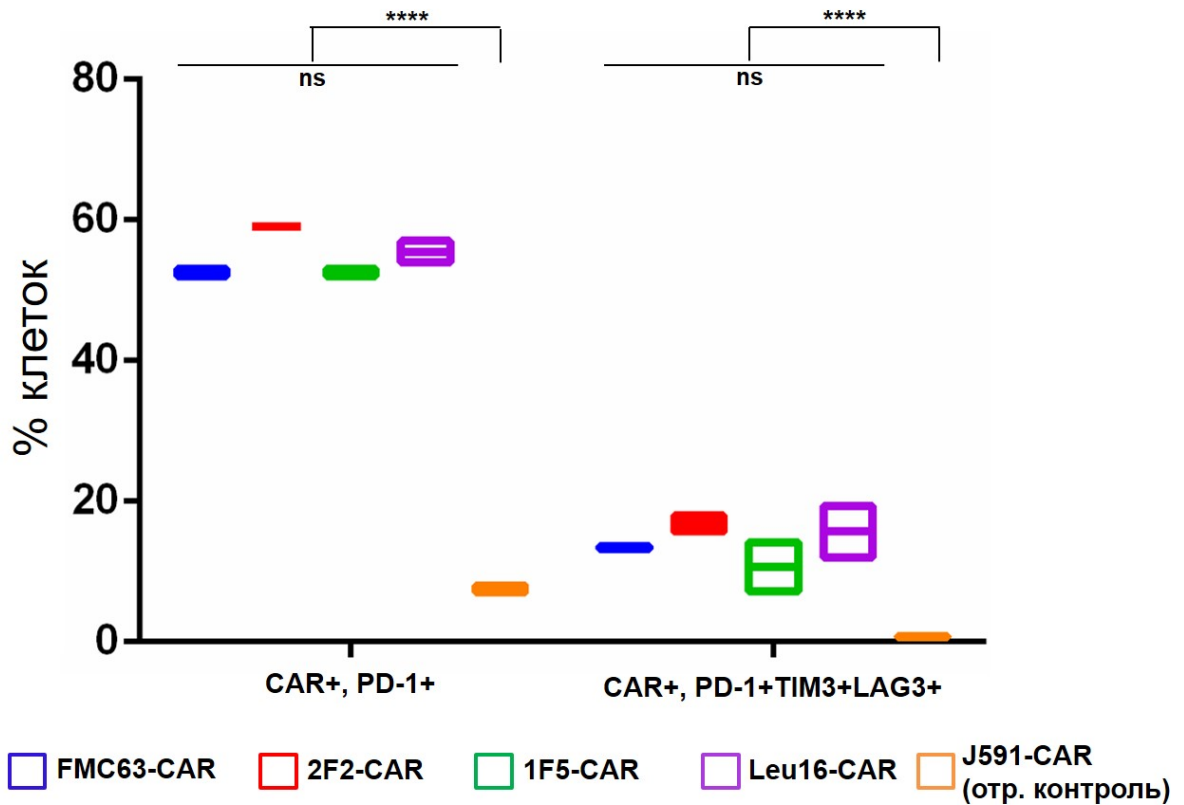


Рисунок 13. Процент истощенных CAR T-клеток на 8-й день теста на повторяющуюся цитотоксичность. Показаны средние значения доли клеток от максимума с указанием диапазона. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, $n=4$, GraphPad Prism, v6, **** – $p<0,001$).

3.2.3. CD20-специфичные CAR T-клетки обеспечивают сравнимый уровень специфической активации

На сегодняшний день целевая аффинность CAR остается областью проб и ошибок и в значительной части случаев корректируется в зависимости от характерного диапазона плотности антигена на опухолевых клетках [432–435]. Однако частой проблемой является снижение плотности экспрессии антигена на поверхности опухолевых клеток[436].

Для того чтобы проверить, способны ли CAR T-клеточные продукты распознавать клетки-мишени со сниженным уровнем экспрессии белка-мишени, были получены две моноклональные линии НЕК293Т-CD20 с эктопической экспрессией белка CD20, но на более низком уровне, чем у В-клеток линии Raji (позитивный контроль) (рис. 14а). Таким образом, в анализе использовали три варианта клеток-мишеней: линия клеток Raji, экспрессирующая как CD19, так и CD20 на физиологичном уровне, и две линии НЕК293Т-CD20, которые не экспрессируют CD19, а экспрессия CD20 снижена относительно линии Raji. Соответственно, CD19-специфичный CAR должен активировать несущие его T-клетки только после взаимодействия с клетками Raji,

нерелевантный CAR не должен вызывать значимой активации после взаимодействия Т-клеток с этими вариантами клеток, а CD20-специфичные рецепторы – должны активировать клетки после взаимодействия с любыми клетками-мишенями. Все CD20-специфичные CAR Т-клетки демонстрировали достоверное падение уровня экспрессии маркера ранней активации Т-клеток – белка CD69. Несмотря на значимо сниженный уровень экспрессии CD20 у обоих моноклонов HEK293T-CD20, активация CAR Т-клеток была снижена, но не отсутствовала. При этом CAR Т-клетки на основе scFv 1F5 продемонстрировали значимо более высокий уровень активации после коинкубации с клоном В3, имеющим самую низкую плотность CD20 на поверхности, по сравнению с CAR Т-клетками на основе Leu16 (рис. 14б).

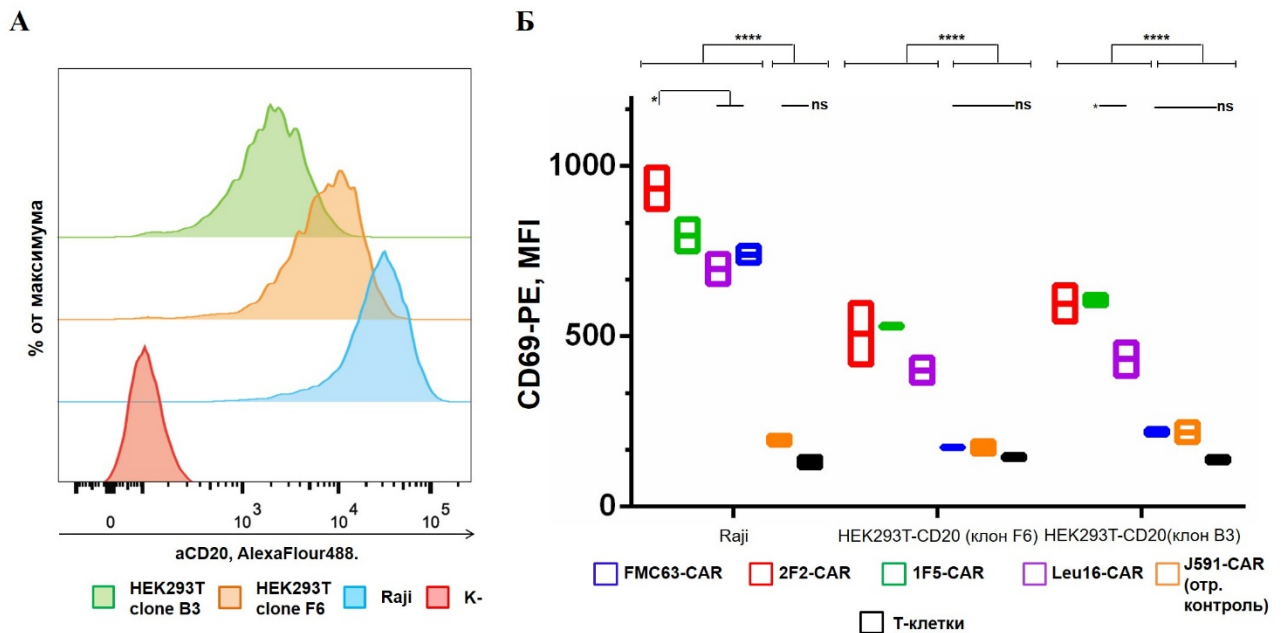


Рисунок 14. CD20-специфичные CAR Т-клетки демонстрируют специфическую активацию (экспрессию CD69) при коинкубации с клетками-мишенями. А – Моноклональные субклоны В3 и F6 линии HEK293T-CD20 демонстрируют сниженный уровень экспрессии CD20 по сравнению с клеточной линией Raji (CD19⁺ CD20⁺) при детекции поверхностной экспрессии CD20 при помощи проточной цитометрии. Б – CD20-специфичные CAR Т-клетки активируются после коинкубации с клетками-мишенями, экспрессирующими CD20 на высоком (Raji), среднем (клон F6) или низком (клон В3) уровне. Снижение уровня экспрессии CD69 наблюдалось при снижении уровня экспрессии CD20. Показаны средние значения интенсивности флуоресценции с указанием диапазона. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, n=4, GraphPad Prism, v6, * – p<0,05, **** – p<0,0001).

3.2.4. CD20-специфичные CAR T-клетки перенаправляют цитотоксичность первичных T-клеток здорового донора

Для определения уровня цитотоксичности использовали два протокола, чаще всего встречающиеся в литературе и являющиеся стандартными для характеристики новых CAR. Это тесты на моментальную и на повторяющуюся цитотоксичность. В тесте на моментальную цитотоксичность CAR T-клетки инкубируют с клетками-мишенями 4 часа в различных соотношениях E:T, после чего производится подсчет мертвых клеток-мишеней. В данном тесте не было показано достоверных отличий между CD20-специфичными и контрольными CD19-специфичными CAR T-клетками, и все они проявляли достоверно более высокую цитотоксичность по сравнению с нерелевантным CAR (рис. 15).

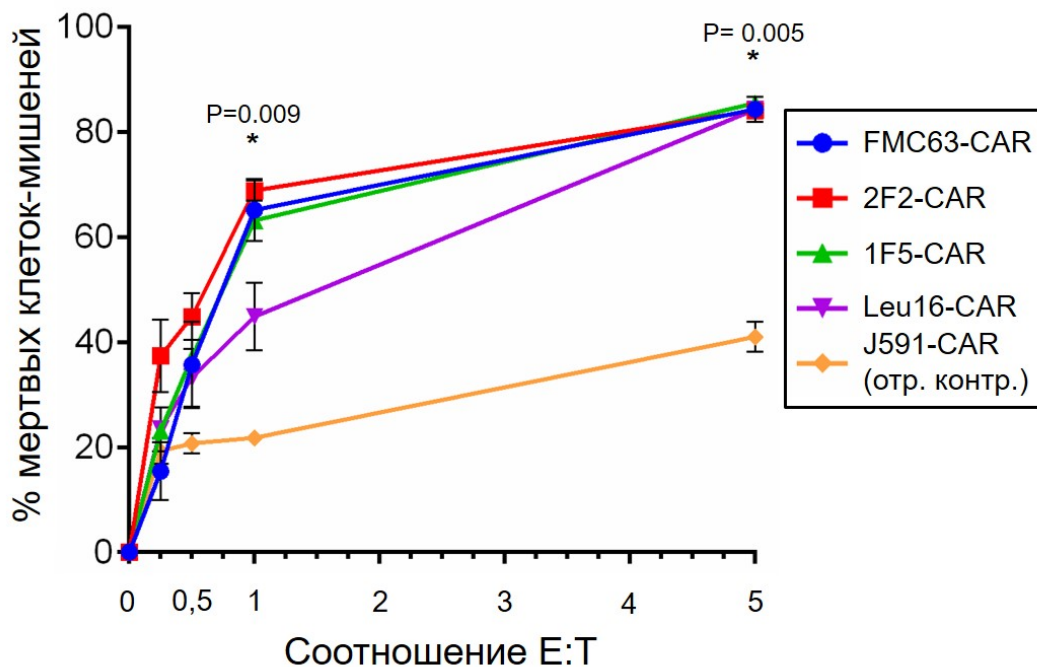


Рисунок 15. CD19- и CD20-специфичные CAR T-клетки (E) проявляют схожие уровни цитотоксичности против клеток-мишеней (T) Nalm6-CD20 (CD19+, CD20+) через 4 часа коинкубации в различных соотношениях E:T. В качестве негативного контроля использовали нерелевантные PSMA-специфичные J591-CAR T-клетки. Показаны средние значения уровня цитотоксичности \pm SD. Статистический анализ был выполнен при помощи непараметрического t-теста (n=8, GraphPad Prism, v6, * – p<0,05).

Поскольку в организме пациентов CAR T-клетки как правило циркулируют длительное время и постоянно взаимодействуют как с опухолевыми, так и с нормальными клетками, несущими целевой антиген, то такая хроническая стимуляция может негативно сказываться на их функциональном статусе. Таким образом, более релевантным считается определение уровня повторяющейся цитотоксичности [437]. Для этого CAR T-клетки смешивали с клетками-

мишенями линии Nalm6-CD20 в соотношении 1:2 в среде без экзогенных цитокинов, инкубировали двое суток, после чего производили подсчет числа клеток-мишеней и добавляли их до восстановления исходного соотношения. Данную процедуру проводили раз в двое суток на протяжении 8 дней (рис. 9).

В таком варианте все CAR T-клетки работают достоверно лучше нерелевантного контроля и, несмотря на то, что достоверных отличий обнаружено не было, CAR на основе scFv 1F5 обнаруживал тенденцию к утрате контроля опухолевой нагрузки после 8 дня (рис. 16).

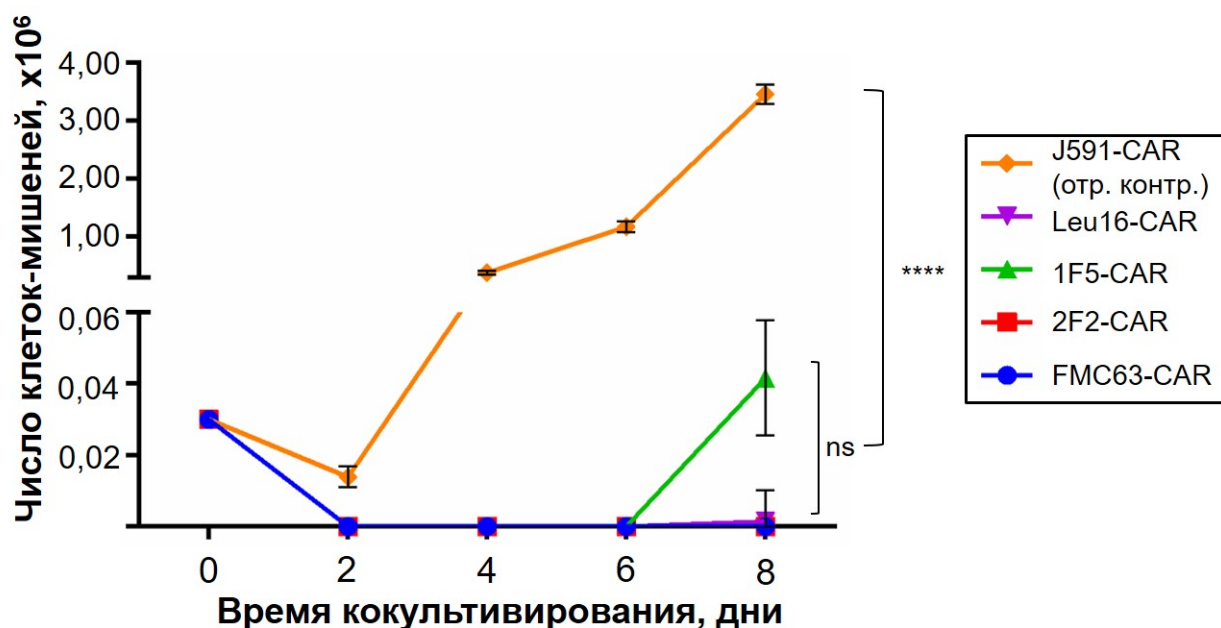


Рисунок 16. CAR T-клетки проявляют сравнимые уровни цитотоксичности в тесте на повторяющуюся цитотоксичность. В качестве негативного контроля использовали нерелевантные PSMA-специфичные J591-CAR T-клетки. Показаны средние значения количества клеток с указанием диапазона. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, n=8, GraphPad Prism, v6, **** – $p < 0,001$).

В совокупности представленные данные показывают, что все полученные CD19- и CD20-специфические CAR T-клетки проявляют сравнимую друг с другом и достоверно большую цитотоксичность, чем нерелевантные контрольные CAR T-клетки. Необходимо отметить, что на восьмой день теста на повторяющуюся цитотоксичность в субпопуляционном составе CAR T-клеточных продуктов наблюдаются выраженные отличия (рис. 16). В FMC63-CAR T-клеточном продукте было значимо больше клеток, имеющих фенотип T_{CM}, и меньше доля клеток фенотипа T_{EM}. Статистически значимых отличий среди представленности популяций наивных и терминально дифференцированных T-клеток не было обнаружено. Фактически субпопуляция

CAR ТЕМРА клеток не обнаруживалась к 8-му дню, даже несмотря на то, что они первоначально присутствовали как среди немодифицированных Т-клеток, так и вскоре после трансдукции. Вероятно, это связано с их избирательным истощением и элиминацией после хронической стимуляции опухолевыми клетками. Кроме того, известно, что терминально дифференцированные CAR Т-клетки хотя и обладают высокой цитотоксичностью, их пролиферативная активность достаточно ограничена [294,438,439].

С целью более детальной характеристики полученных CAR Т-клеточных продуктов также было проведено измерение уровня секреции ими провоспалительных цитокинов: IL2 и IFN γ , после взаимодействия с клетками-мишенями. Все CD19- и CD20-CAR Т-клетки секретировали и IL2, и IFN γ на достоверно более высоком уровне, чем нерелевантные CAR Т-клетки (рис. 17).

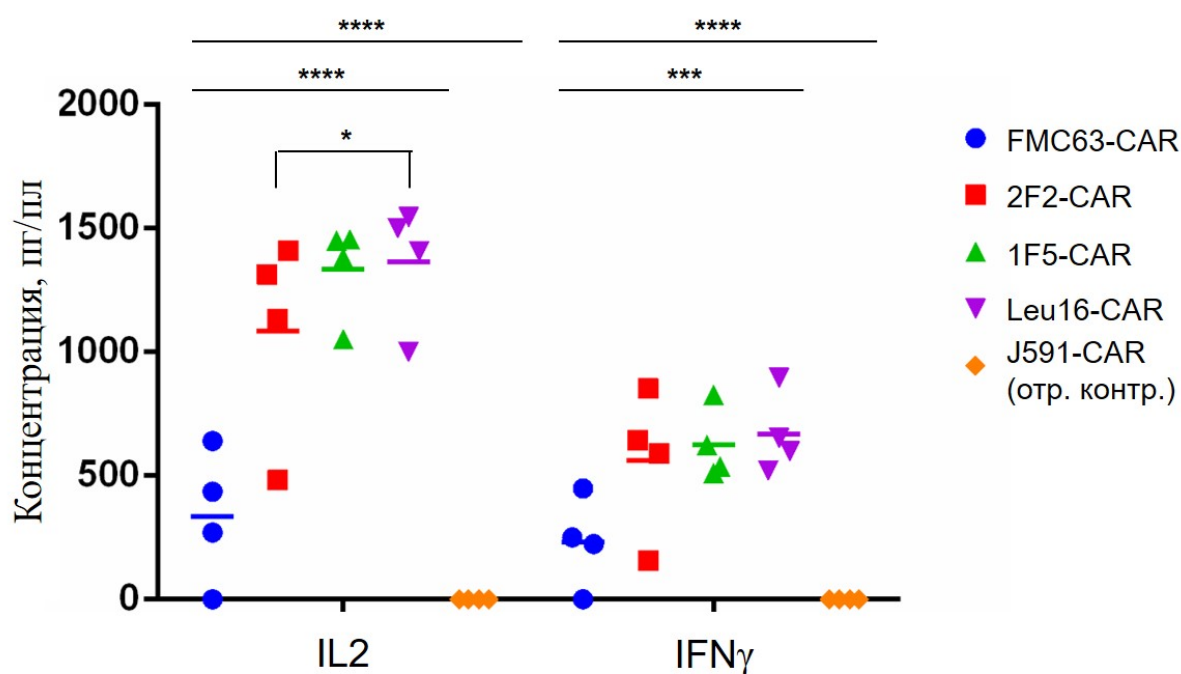


Рисунок 17. Уровни секреции IL2 и IFN γ после 12-часовой коинкубации CAR Т-клеток с клетками-мишенями Nalm6-CD20 (E:T=1:2). Для каждого донора приведено среднее значение концентрации, эксперимент выполнен в двух биологических повторах. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, n=8, GraphPad Prism, v6, * – p<0,05, *** – p<0,005, **** – p<0,0001).

Кроме этого, выявились достоверные отличия в уровнях секреции обоих цитокинов между FMC63-CAR и остальными CD20-специфичными CAR Т-клетками. С одной стороны, высокий уровень секреции цитокинов характеризует высокий цитотоксический потенциал CAR Т-клеточного продукта, а также способность мобилизовать другие звенья иммунной системы, что должно приводить к более полной элиминации опухоли и долговременному противоопухолевому контролю. С другой стороны, слишком высокие уровни секреции

цитокинов связывают с фенотипом активационно-индуцированной клеточной гибели (AICD) [440], Т-клеточным истощением [441,442] и более высокой вероятностью развития синдрома выброса цитокинов [413], который является жизнеугрожающим состоянием и требует проведения экстренной медикаментозной терапии в условиях реанимации. С такой точки зрения, слишком интенсивная секреция цитокинов может быть предиктором серьезных осложнений после введения CAR Т-клеток пациенту. Поскольку в настоящее время невозможно точно оценить риск развития синдрома выброса цитокинов, равно как и эффективность CAR терапии, опираясь только на тесты *in vitro*, необходимо проведение дополнительных экспериментов на релевантных доклинических моделях [443–449].

3.3. Характеризация активности полученных CAR Т-клеток на модели ксенотрансплантированной опухоли в эксперименте *in vivo*

Для проверки функциональности полученных CAR Т-клеток и сравнения их в тестах *in vivo* описано множество подходов, в которых варьируют как дозу ксенотрансплантируемых опухолевых клеток, так и дозу, и время введения CAR Т-клеток для терапии. Нами была выбрана схема эксперимента, в котором экспериментальным животным системно вводят опухолевые клетки, а CAR Т-клетки вводят таким образом, что 100% животных с привитыми опухолям в группе положительного контроля (FMC63-CAR) в конечном итоге погибают.

Для этого, 6-8 недельным самкам мышей линии NSG внутривенно вводили по 3×10^5 клеток линии Nalm6-CD20, являющейся стандартной моделью B-ALL[450]. На 8 сутки мыши были рандомизированы и разбиты по 5 животных на группу, после этого они получали терапию CAR Т-клетками, доза в 3×10^6 клеток на животное, которая была разбита на 2 введения: на 8 и 14 сутки от момента ксенотрансплантации. В качестве негативного контроля использовали нерелевантные J591-CAR Т-клетки, специфичные к PSMA, в качестве положительного контроля FMC63-CAR Т-клетки, специфичные к CD19 (рис. 18а). Все CAR Т-клеточные продукты достоверно увеличивали продолжительность жизни мышей по сравнению с нерелевантным контролем. Достоверных отличий между CD19- и CD20-специфическими CAR Т-клетками выявлено не было, однако Leu16- и 1F5-CAR обнаруживают тенденцию к более полному контролю над опухолью (рис. 18б).

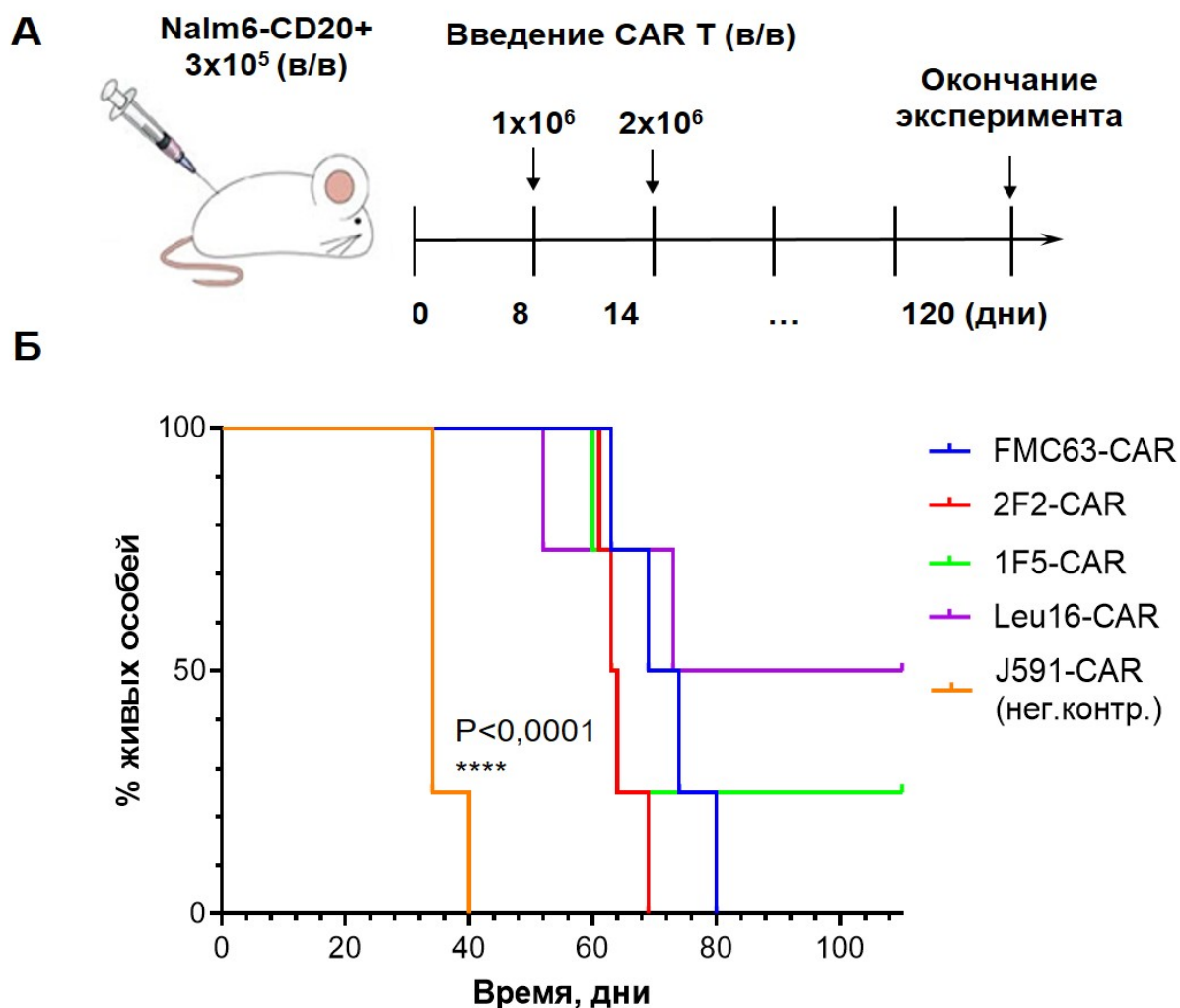


Рисунок 18. CD20-специфичные CAR T-клетки функциональны на модели *in vivo*. А – Схема эксперимента. Б – Применение как CD19-специфичного, так и CD20-специфичных CAR T-клеточных продуктов приводит к достоверному увеличению продолжительности жизни мышей с ксенотрансплантированной опухолью в сравнении с нерелевантными PSMA-специфичными CAR T-клетками, при этом использование 1F5- и Leu16-CAR T-клеточных продуктов обнаруживает тенденцию к более эффективному контролю опухолевой нагрузки. Статистический анализ был выполнен с использованием метода Каплана-Майера с последующим логарифмическим ранговым тестом (тест Манталя-Кокса) (в каждой группе было по 5 животных, GraphPad Prism, v6, **** – $p < 0,0001$).

Полученные нами экспериментальные данные демонстрируют сравнительную эффективность вновь созданных, специфичных к CD20, CAR в проведенных тестах *in vitro* и *in vivo*. Зафиксированы отличия в уровне секреции провоспалительных цитокинов: T-клетки, несущие анти-CD20 CAR, секретируют значимо больше IL2 и IFN γ по сравнению с анти-CD19 CAR T-клетками. Такое различие может быть объяснено большим процентным содержанием T_{EM}-клеток в CD20-специфических CAR T-клеточных продуктах, поскольку известно, что эти клетки секретируют больше цитокинов, чем клетки T_{CM} [451]. Эти различия потенциально могут

сказаться во время применения в клинической практике, однако, не могут быть продемонстрированы в тесте *in vivo*, в котором, как и ожидалось, CD19- и CD20-специфические CAR T-клетки обеспечивали сопоставимые уровни противоопухолевой активности. Секретия провоспалительных цитокинов может сыграть как положительную роль, позволив CAR T-клеткам дольше персистировать, сильнее пролиферировать и вовлекать другие клетки иммунной системы. С другой стороны, слишком высокий уровень цитокинов может приводить к неконтролируемому синдрому выброса цитокинов, что является тяжелым нежелательным явлением во время терапии. Таким образом, необходима дополнительная проверка безопасности полученных продуктов на релевантной доклинической модели.

Важно отметить, что по сравнению с остальными CD20-специфическими CAR, конструкция 2F2-CAR обладает еще одним значимым преимуществом, а именно, сниженной иммуногенностью, поскольку последовательность scFv 2F2 является полностью человеческой, а не мышинной, как FMC63 или Leu16/1F5. Использование человеческих последовательностей в составе CAR может снизить вероятность развития реакций, ограничивающих персистенцию CAR T-клеток, и тем самым повысить эффективность такого клеточного продукта. Хотя для референсного CD19-специфического CAR на основе FMC63 уровень формирующихся антител против CAR недостаточен для негативного влияния на эффективность и безопасность применения у пациентов с В-клеточными неоплазиями [452], Т-клеточный иммунный ответ против чужеродных для человека белков в составе CAR представляет значительно более серьезную проблему [129,453–455].

Как отмечалось выше, все конструкции CAR, использованные в этой работе, использовали идентичную структуру самого рецептора, что позволяет сделать выводы о влиянии исключительно антигенраспознающего домена на эффективность таких CAR T-клеток. Природой таких различий могут быть минорные отличия во взаимодействии с белком-мишенью.

В совокупности наши данные указывают на то, что оптимальный CD20-специфический scFv не может быть легко определен исключительно на основе данных экспериментов *in vitro*, и подчеркивают тот факт, что эффективность CAR T-клеточной терапии в значительной степени определяется природой ее мишени, включая плотность и расположение на клеточной мембране клеток, аффинность самого рецептора, и другими факторами. Тем не менее, наша доклиническая оценка CD20-специфических CAR T-клеток на основе 2F2 демонстрирует эффективность на мышинной модели, сопоставимую с референсным FMC63-CAR.

3.4. Создание В-клеточной линии Nalm6-Nluc-copGFP для прижизненной визуализации опухолевой нагрузки и ответа на терапию

Оценка общей выживаемости является важным параметром при исследовании новых CAR, однако для более полной характеристики важно иметь возможность наблюдать динамику изменений опухолевой нагрузки во время терапии. Система прижизненной визуализации IVIS Spectrum позволяет производить количественную детекцию люминесцентного и флуоресцентного сигнала и оценивать, как суммарную опухолевую нагрузку, так и ее локализацию в теле животного в динамике, являясь общепринятым стандартом для доклинических исследований новых клеточных продуктов. Для проведения такого исследования необходимо модифицировать ксенотрансплантируемую клеточную линию для стабильной экспрессии люциферазы, а после чего вводить лабораторным животным субстрат и оценивать интенсивность свечения клеток. Вместе с тем, известно, что интенсивность люминесценции наиболее часто распространенных люцифераз может быть недостаточной, что затрудняет детекцию малого количества клеток. Кроме того, используемые субстраты этих люцифераз являются низко стабильными, что также затрудняет проведение исследований. Альтернативным вариантом может стать люцифераза Nluc (NanoLuc), имеющая небольшой размер (19 кДа), высокую стабильность в широком диапазоне температур и значений pH и обладающая высокой удельной интенсивностью люминесценции, приблизительно в 150 раз превышающей Fluc и Rluc. Сдерживающими факторами для использования этого фермента являются низкая растворимость, биодоступность и высокая токсичность субстрата – фуримазина. Такой субстрат является токсичным для мелких животных и требует внутривенного введения, что значительно осложняет процедуру визуализации [456,457]. Для преодоления данных ограничений нами было предложено использовать в качестве альтернативного субстрата h-целентеразин и сравнить два варианта целентеразина – нативный целентеразин и h-целентеразин – с фуримазином в тесте *in vitro*.

В первую очередь была создана клеточная линия Nalm6, стабильно экспрессирующая целевую кассету, в состав которой входит люцифераза Nluc и зеленый флуоресцентный белок копеподы *Pontellina plumata* copGFP под контролем сильного конститутивного промотора гена *EF1a* человека (рис. 19а). Клетки были трансдуцированы псевдотипированными лентивирусными частицами. Затем из полученной поликлональной популяции была создана целевая моноклональная линия и охарактеризована при помощи проточной цитометрии с оценкой интенсивности экспрессии copGFP (рис. 19б), в дальнейшем все работы велись с данной моноклональной линией.

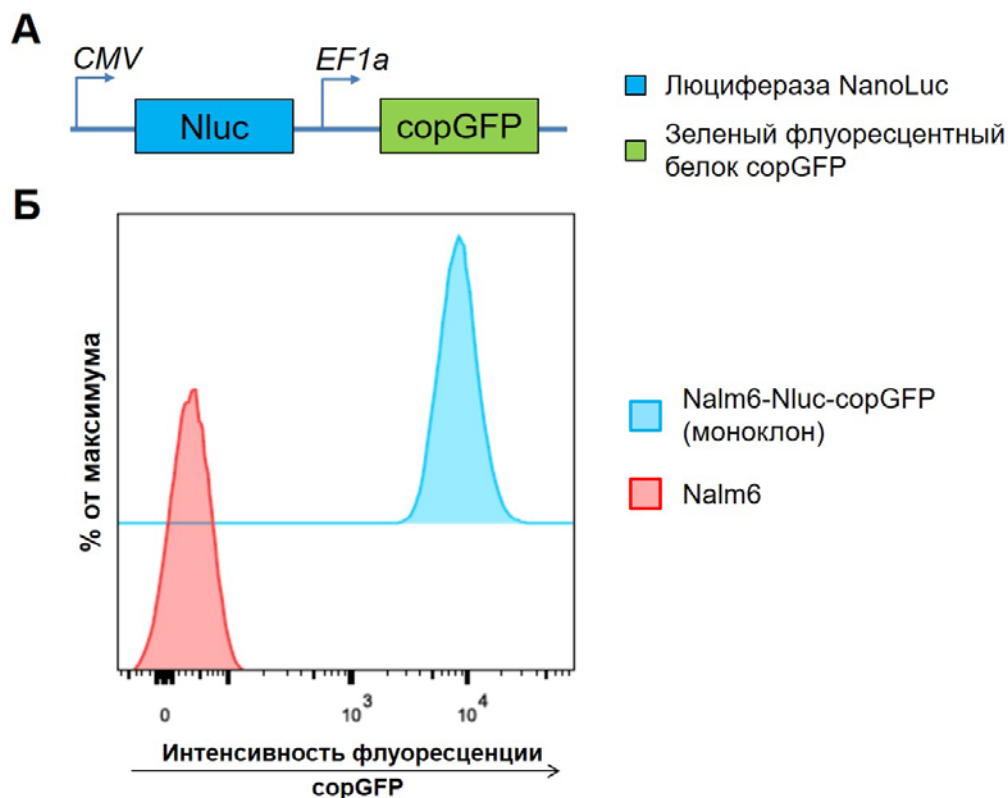


Рисунок 19. Получение и характеристика целевой клеточной линии Nalm6-Nluc-copGFP. А – Схематичное изображение структуры кассеты, кодирующей люциферазу Nluc и зеленый флуоресцентный белок copGFP; Б – Полученная моноклональная линия Nalm6-Nluc-copGFP экспрессирует copGFP (анализ при помощи проточной цитофлуориметрии).

Для оценки и сравнения между собой интенсивности люминесценции в зависимости от количества клеток и варианта субстрата, было проведено сравнение в тесте *in vitro*. В первую очередь, зафиксировав концентрацию субстрата в точке 10 мкМ, была проведена оценка возможности детекции от 10 до 7290 клеток/лунку. Полученные данные показывают, что использование h-целентеразина достоверно повышает интенсивность сигнала, а использование нативного целентеразина – на порядок ниже относительно фуримазина (рис. 20а). Кроме яркости сигнала важна и его стабильность в течении времени, поскольку этого требует работа с животными. Была осуществлена оценка временной динамики угасания сигнала люминесценции с течением времени, для этого была выбрана точка 2430 клеток/лунку и проведена детекция временной динамики изменения интенсивности люминесценции. По результатам данного теста (рис. 20б) установлено, что, в отличие от фуримазина, обладающего высокой стабильностью испускания сигнала, при использовании h-целентеразина происходит резкое усиление, а потом плавное ослабление интенсивности люминесценции. Однако яркость его люминесценции и последующая стабилизация сигнала, а также большая растворимость и меньшая токсичность делают его перспективным кандидатом для использования в тестах *in vivo*. В свою очередь,

нативный целентеразин был исключен из исследования ввиду его низкой интенсивности люминесценции и крайне низкой стабильности в водных растворах.

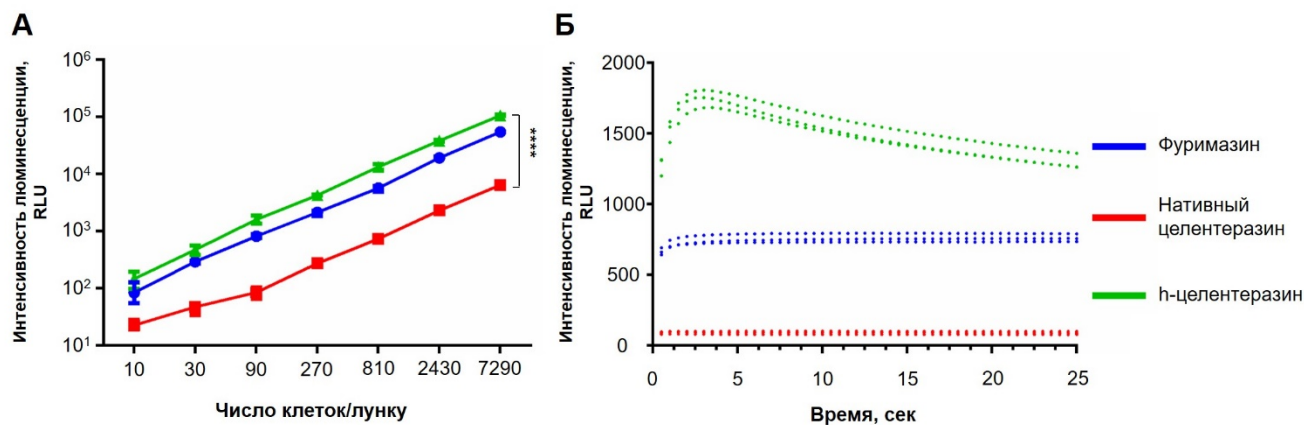


Рисунок 20. Сравнение различных люциферазных субстратов в тестах *in vitro*. А – Сравнение интегральных интенсивностей люминесценции за 25 секунд при использовании различных субстратов (10 мкМ) в зависимости от числа клеток Nalm6-Nluc-copGFP. Статистический анализ отличий между группами был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, n=3, GraphPad Prism, v6, **** – p < 0,001); Б – Средняя интенсивность биолюминесценции с течением времени для каждого из субстратов при концентрации 10 мкМ и числе 2430 клеток Nalm6-Nluc-copGFP/лунку (n=3).

Чтобы визуализировать ксенотрансплантированные клетки линии Nalm6-Nluc-copGFP в динамике и оценить относительную чувствительность метода, был проведен пилотный эксперимент, схема которого приведена на рисунке 21а. После внутривенного введения 3×10^5 клеток линии Nalm6-Nluc-copGFP 14 самцам мышей линии NSG на 5-й день проводили визуализацию и рандомизацию мышей на две группы. Одним мышам на следующий день вводили терапевтические CD19-специфичные CAR T-клетки (FMC63-CAR, референсный CAR), другим – контрольные CAR T-клетки от того же донора, полученные тем же способом и идентично активированные/культивированные *ex vivo*, со специфичностью к белку PSMA, отсутствующему на поверхности опухолевых клеток (J591-CAR, отрицательный контроль). Далее проводили еженедельную визуализацию на 12, 19, 26, 33, 40 и 47-й дни (рис. 21а). Отмечалась дальнейшая прогрессия заболевания у контрольных мышей, а у мышей, которым были введены FMC63-CAR T-клетки, наблюдали стабилизацию интенсивности сигнала, что свидетельствовало об установлении контроля над опухолью (рис. 21б). Суммарные данные по средней интенсивности люминесценции для обеих групп приведены на рисунке 21в.

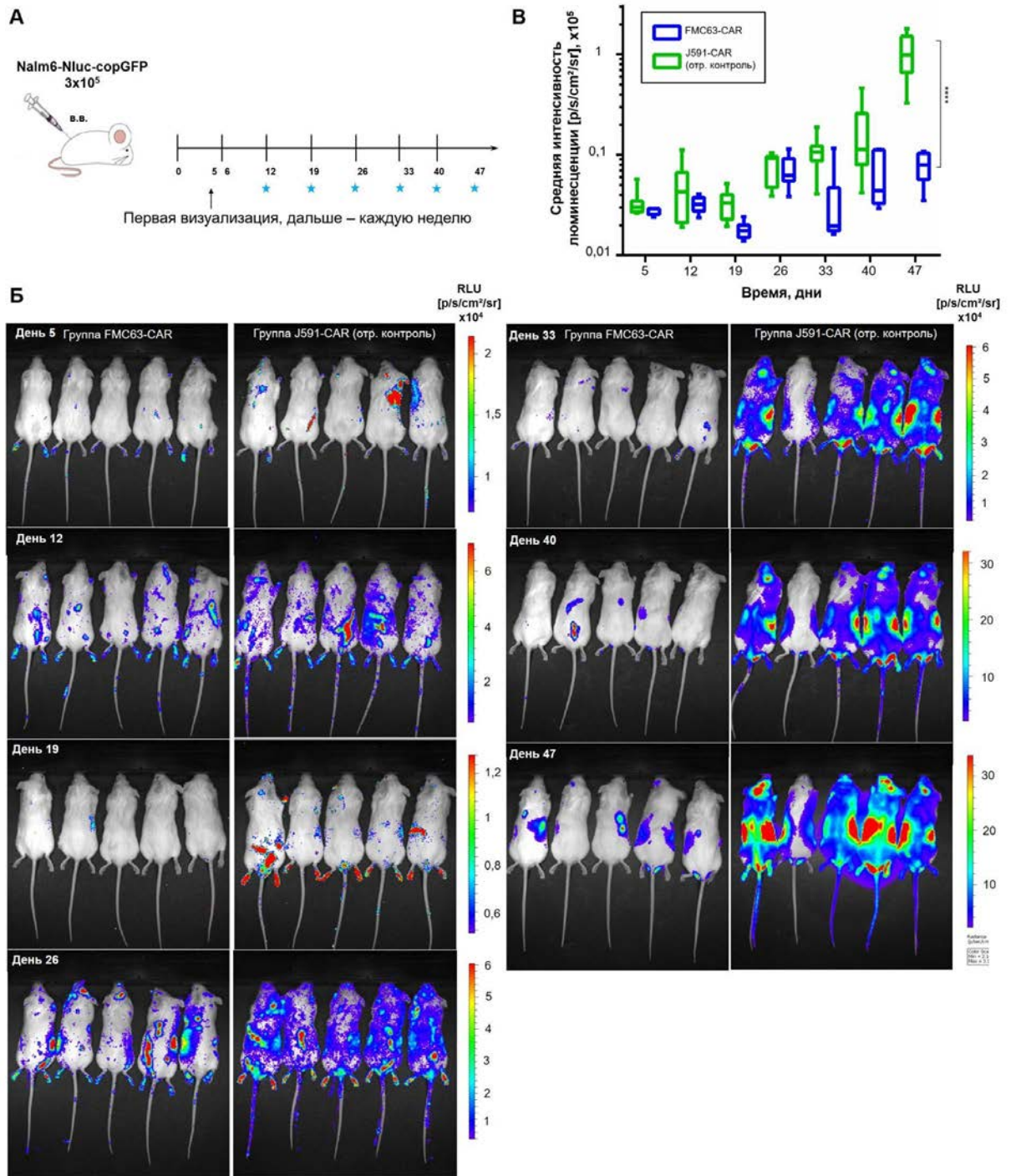


Рисунок 21. Прижизненная визуализация ксенотрансплантированных клеток линии Nalm6-Nluc-copGFP при терапии мышей CAR T-клеточными продуктами. А – Схема эксперимента; Б – *in vivo* визуализация после интраперитонеального введения 0,491 мкмоль (20 мкг) h-целентеразина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера. Спектральные данные были получены в течение 3 минут, через 5 минут после введения субстрата. Репрезентативные изображения приведены для 5 из 7 мышей в каждой группе; В – Изменения относительной интенсивности люминесценции от времени после введения в каждой группе животных (n = 7). На 47-й день интенсивность флуоресценции отличается достоверно, статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, GraphPad Prism, v6, **** – p < 0,001).

Проведенный эксперимент позволил подтвердить, что использованные процессы получения CAR Т-клеток позволяют создавать полностью функциональный клеточный продукт, обладающий выраженной противоопухолевой активностью *in vivo* на ксенотрансплантированной модели, а также показал возможность прижизненной визуализации и отслеживания динамики опухолевых клеток, экспрессирующих NLuc при помощи доступного и нетоксичного субстрата, h-целентеразина.

В состав экспрессионной кассеты помимо последовательности, кодирующей люциферазу NLuc, входят последовательности, кодирующие флуоресцентный репортёр copGFP. Такой дизайн позволяет не использовать химические метки в *in vitro* тестах и детектировать опухолевые клетки в образцах тканей животных в процессе эксперимента *in vivo* при помощи проточной цитометрии. Репрезентативные данные анализа образцов костного мозга и периферической крови для одного животного из контрольной группы приведены на рисунке 22.

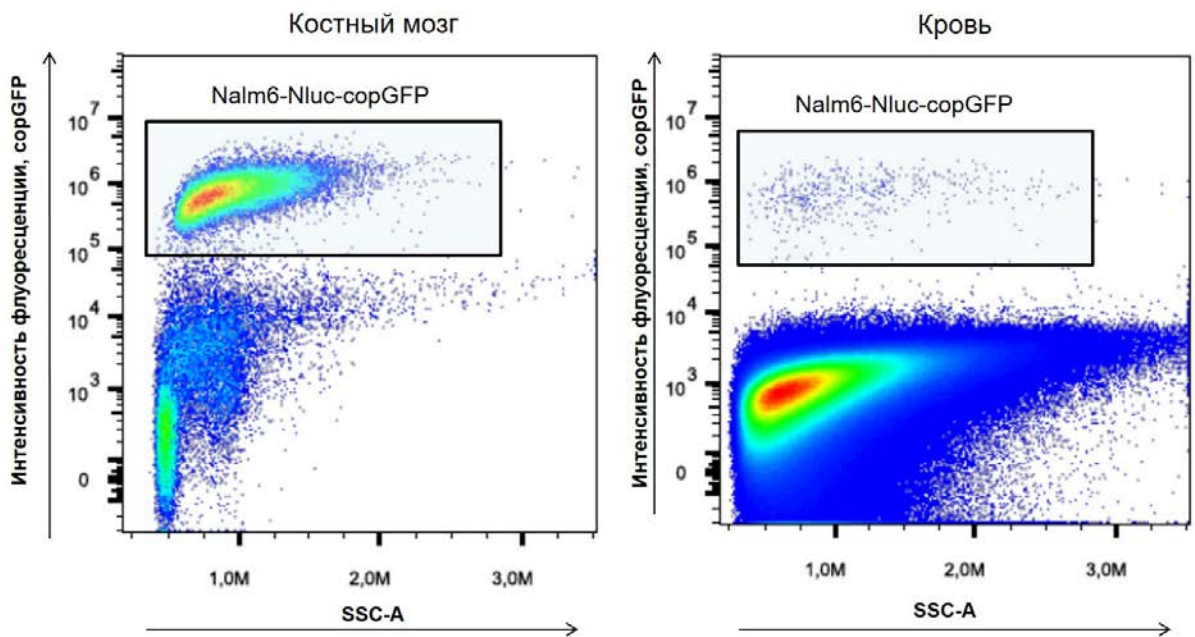


Рисунок 22. Анализ образцов костного мозга и крови животного из контрольной группы (J591-CAR) при помощи проточной цитометрии.

Эти данные соответствуют данным *in vivo* визуализации, свидетельствующим о высоком содержании опухолевых клеток Nalm6-NLuc-copGFP в костном мозге и периферической крови мышей, получавших терапию контрольными CAR Т-клетками.

В отличие от наиболее распространенной люциферазы Fluc, длина волны испускаемого света для люциферазы NLuc практически на 100 нм меньше. Теоретически такие физические характеристики должны приводить к более интенсивному поглощению люминесцентного сигнала тканями, что может маскировать люминесценцию от глубоко лежащих органов. Однако

нами не было замечено принципиального отличия паттернов распределения люминесценции по сравнению с существующими литературными данными с использованием Fluc, что связано, по-видимому, со значительно более высоким уровнем испускаемого Nluc сигнала, компенсирующего его большее поглощение [458].

Суммируя вышесказанное, ферментативно-субстратная пара Nluc/h-целентеразин является крайне перспективной для доклинического этапа разработки широкого спектра противоопухолевой терапии, в том числе CAR Т-клеточной, при проведении тестов *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

3.5. Создание и характеристика *in vitro* CAR, специфичных одновременно к CD19 и CD20

Зачастую причиной неудачи терапии CAR Т-клетками является ускользание опухолевых клеток из-под контроля за счет снижения уровня экспрессии или изменения самой мишени, на которую нацелен CAR [459,460]. Способы решения такой проблемы могут быть достаточно разнообразными и каждый из них имеет свои преимущества и недостатки.

В первую очередь возможно создание двух (или более) различных CAR Т-клеточных продуктов, каждый из которых имеет разную специфичность. В результате для одного пациента необходимо проводить несколько независимых технологических процессов, каждый из которых достаточно затратен, кроме того, необходимо большее количество стартового материала, что также не всегда является возможным. В то же время, такой подход наиболее стандартизован и отработан, так что процедуры не нуждаются в дополнительной разработке или оптимизации уже существующих протоколов.

Кроме того, можно проводить одновременную или последовательную трансдукцию Т-клеток двумя различными векторами, кодирующими CAR разной специфичности. Преимуществами такого пути являются очевидно большая гибкость и возможность использования уже существующих расходных материалов без необходимости дополнительных исследований и производства нового вектора. При использовании такого подхода стоимость снижается лишь за счет производства клеточного продукта, а наибольший вклад в итоговую стоимость по-прежнему вносит стоимость вектора. Кроме того, для данного метода характерна меньшая воспроизводимость между различными продуктами от разных доноров. При таком процессе часть клеток будет трансдуцирована только одним вектором, а доля клеток одновременно с двумя CAR на поверхности будет сильно варьировать. Наконец, при таком технологическом процессе необходимо четко подбирать множественность инфекции (MOI) для каждого из векторов, чтобы количество встроеной целевой кассеты на геном Т-клеток соответствовало законодательным нормам.

Решением проблемы может стать увеличение специфичности самого рецептора. Это можно реализовать двумя принципиально разными путями: созданием бицистронных конструкций или добавлением дополнительного антигенраспознающего домена в структуру CAR [461]. Оба этих подхода являются перспективными и для выбора оптимального были созданы плазмидные конструкции, кодирующие CAR, специфичные одновременно к CD19 и CD20, в лентивирусном векторе.

В случае бицистронных или дуальных конструкций кассеты, кодирующие два различных CAR, последовательно располагаются в лентивирусном векторе, а их экспрессия реализуется либо с одного общего промотора и тогда CAR-кассеты соединены через P2A-сайт «саморасщепления» полипептидной цепочки (dualCAR), либо с использованием двух независимых промоторов: EF1 α человека и CMV (dualCAR_2P) (рис. 23). Структурно каждый CAR организован одинаково: лидерный пептид, заимствованный от белка CD8 α человека или Fc ϵ RI α ; scFv, распознающие CD19 или CD20; шарнирный участок IgG4 или CD8 α человека; трансмембранный район CD28 человека и сигнальные последовательности 4-1BB и CD3 ζ человека.

В случае биспецифических/тандемных рецепторов – два scFv последовательно соединены длинным и гибким линкером, после которого следуют стандартные домены рецептора: шарнирный район CD8 α человека, трансмембранный участок CD28 человека и сигнальные последовательности 4-1BB и CD3 ζ человека. При этом, biCAR и revbiCAR отличаются друг от друга порядком расположения вариабельных доменов, узнающих CD20 (рис. 23, 24a).

Таким образом, в случае дуальных конструкций, каждый антигенраспознающий домен CAR имеет свой шарнирный и сигнальные домены, а в случае биспецифических/тандемных CAR – для двух антигенраспознающих доменов шарнирная и трансмембранная область одна.

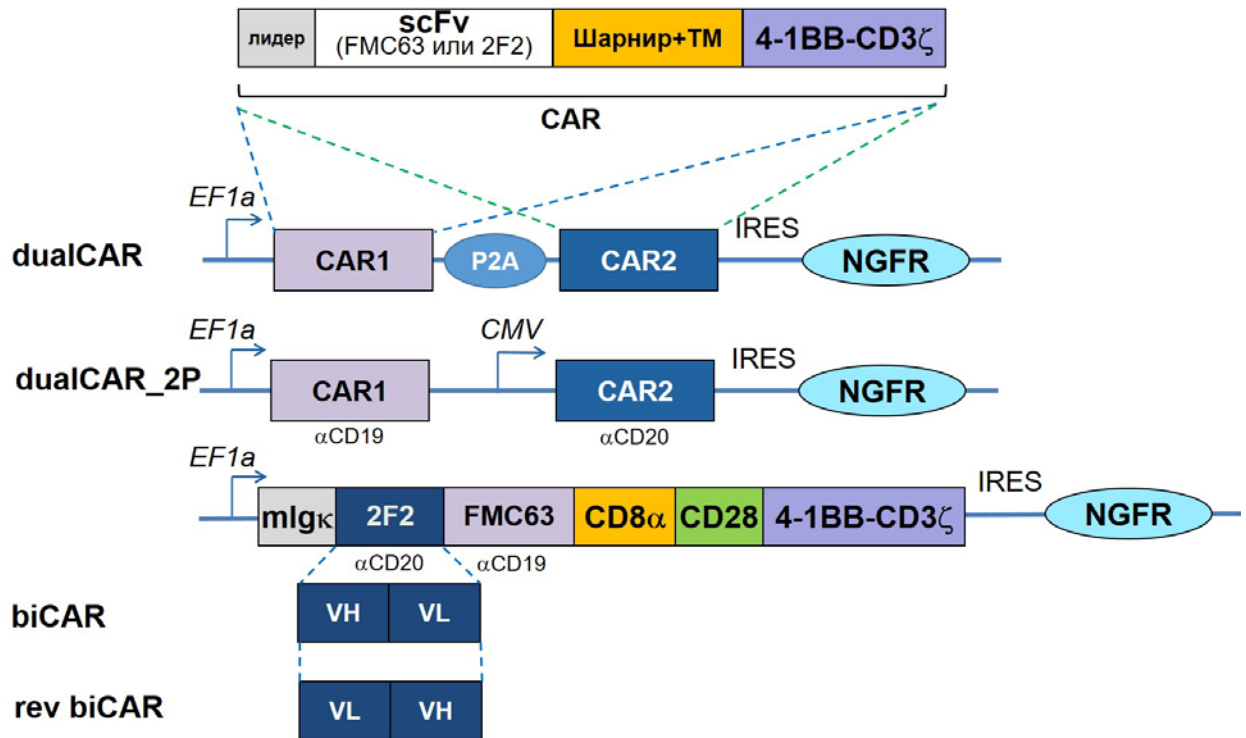


Рисунок 23. Схематичное изображение созданных CAR, специфичных одновременно к CD19 и CD20. Лидер – сигнальный пептид; Шарнир+ТМ – шарнирные и трансмембранные домены рецептора; mlg κ – сигнальный пептид каппа цепи иммуноглобулина мыши; EF1a – промоторная последовательность гена *EF1a* человека; P2A – последовательность «проскока» рибосомы; CD8 α – шарнирный участок, заимствованный от белка CD8 α ; 41BB-CD3 ζ – сигнальная последовательность на основе участков белков 4-1BB и CD3 ζ человека; IRES – участок внутренней посадки рибосомы; CMV – ранний промотор цитомегаловируса; NGFR – репортёрный ген, кодирующий лишённый цитоплазматических последовательностей укороченный вариант белка NGFR человека.

Все полученные конструкции были использованы для сборки лентивирусных частиц. Кроме того, в качестве контрольных вариантов были выбраны моноспецифичные CAR, узнающие только CD19, CD20 или PSMA (J591-CAR, отрицательный контроль). Полученные лентивирусные частицы были использованы для трансдукции первичных Т-клеток трех здоровых доноров. Уровень трансдукции измеряли по репортёрному белку NGFR при помощи проточной цитометрии (рис. 246). Он оказался схожим для разных конструкций (50–70%), что позволило нам провести сравнение функциональной активности таких CAR Т-клеток *in vitro*. В то же время необходимо отметить, что моноспецифические CAR Т-клеточные продукты (против CD19, CD20 и PSMA) обогащены более “яркими” клетками, то есть часть клеток экспрессирует CAR-кассету на более высоком уровне. Такие различия могут быть обусловлены особенностью получения лентивирусных частиц. По литературным данным известно, что увеличение размера кодирующей кассеты значительно снижает титр получаемых частиц и обогащает конечный продукт нефункциональными частицами [462]. Кроме этого, так как встройка генетических кассет

происходит случайно в транскрипционно активные районы генома клеток, то встройка большого гена может чаще приводить к нарушению собственного генетического материала клетки. Таким образом, клетки, в которые попало большее количество вирусной РНК и число встроек на геном выше, могут самоэлиминироваться. В случае олигоспецифичных рецепторов размер кассеты увеличивается, что может приводить именно к таким явлениям. Тем не менее, такие ограничения преодолимы, а перспективность подхода не вызывает сомнения.

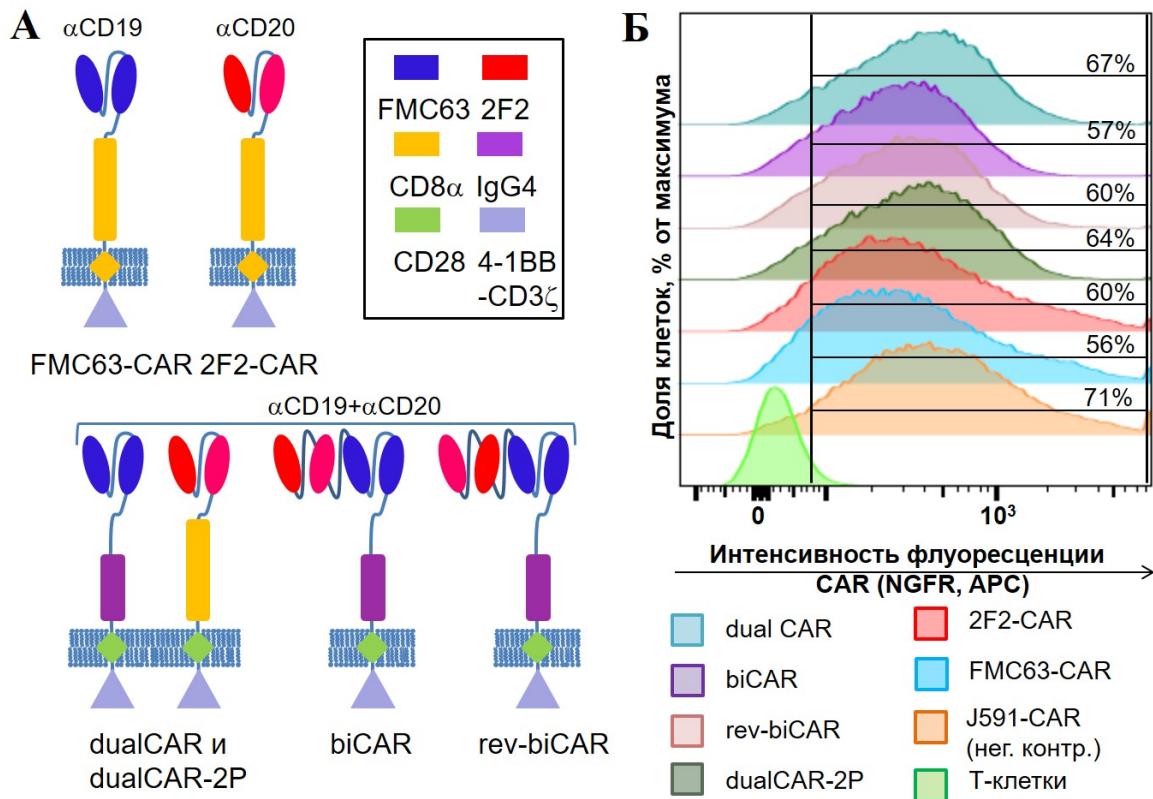


Рисунок 24. Используемые технические процессы позволяют получить все сконструированные биспецифичные CAR Т-клеточные продукты. А – Структура моно- и биспецифичных CAR, Б – Все полученные CAR Т-клеточные продукты демонстрируют схожий уровень экспрессии репортёрного белка NGFR.

Наиболее предсказательным для *in vitro* характеристики вновь полученных рецепторов является проверка CAR Т-клеточных продуктов при хронической стимуляции антигеном (рис. 9). В таком исследовании было обнаружено, что наилучший противоопухолевый контроль обеспечивается моноспецифичными CAR Т-клетками, сопоставимую эффективность демонстрируют CAR Т-клетки с конструкцией dualCAR, несколько хуже при длительной коинкубации уничтожают опухоли CAR Т-клетки с конструкцией dualCAR_2P, и, наконец, варианты revbiCAR и biCAR способны сдерживать рост опухолевых клеток в течение первых пяти дней, но затем теряют эту способность (рис. 25).

Сравнивая полученные четыре варианта дизайна биспецифических CAR T-клеточных продуктов, можно сделать вывод о том, что без дополнительной структурной оптимизации наиболее эффективно работают dualCAR T-клетки (с экспрессией двух независимых CAR с одного промотора, разделенные последовательностью P2A). Бифункциональные CAR (biCAR и rev-biCAR), содержащие два последовательно соединенных антигенраспознающих модуля, становятся нефункциональными после долговременной коинкубации с клетками-мишенями.

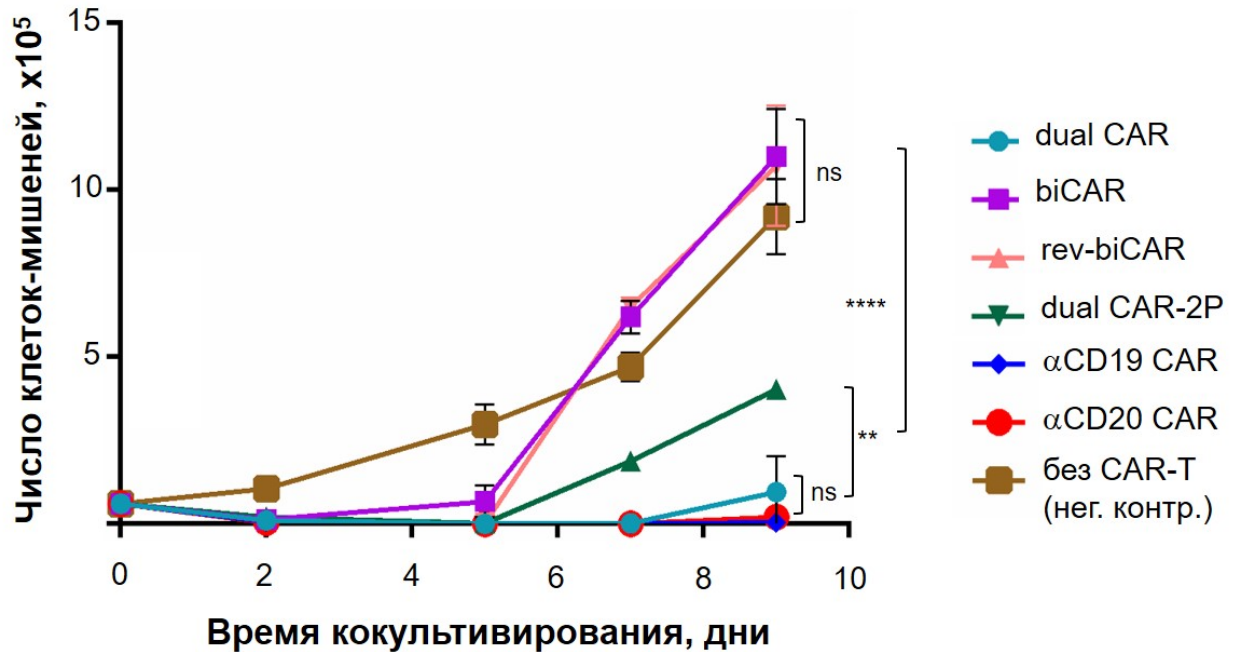


Рисунок 25. Дуальные CD19-CD20-специфичные CAR T-клетки проявляют сравнимую с моноспецифическими CAR T-клетками в тесте на повторяющуюся цитотоксичность. В тесте на повторяющуюся цитотоксичность моноспецифичные CAR T-клетки и dualCAR T-клетки проявляют более значимую цитотоксичность, чем биспецифические варианты. Показаны средние значения количества клеток с указанием диапазона. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, n=6, GraphPad Prism, v6, ns – не достоверно, ** – p<0,01, **** – p < 0,001).

Одним из возможных объяснений этого может быть некорректная пространственная укладка двух последовательных scFv, приводящая к потере функциональности и/или тоническому сигналингу. Менее очевидна причина снижения эффекторных функций варианта dualCAR_2P, показавшего достоверно более низкую цитотоксичность относительно dualCAR. Структурно первая половина кодирующей кассеты (до начала второго промотора) одинакова в обеих конструкциях и кодирует CD19-специфичный CAR, идентичный моноспецифичному контролю (Рисунок 24). Однако активность dualCAR_2P клеток значительно ниже активности моноспецифического анти-CD19 CAR. Возможно, слишком сильный промотор CMV,

использованный в конструкции dualCAR_2P, вызывает сверхэкспрессию CD20-специфичного CAR на поверхности, что в свою очередь приводит к раннему истощению Т-клеток [463].

Согласно современным представлениям, бифункциональные CAR требуют более тонкой оптимизации структуры, а именно подгонки последовательностей цепей антитела, их взаимного расположения, а также длины и гибкости связующего их линкера [464]. Эти усилия по всей видимости оказались результативны: за последние несколько лет в клинических испытаниях великолепно зарекомендовали себя несколько вариантов биспецифических aCD19/aCD20 CAR, а именно prizon-cel [465], TanCAR7 [466,467] и LV20.19 [468]. При этом исследователи, создавшие TanCAR7, использовали последовательности Leu16 и FMC63, в качестве антигенраспознающих доменов, и создали восемь разных вариантов конструкций, лишь один из которых оказался оптимальным. Кроме того, информация о том, что бипаратопный CAR с двумя различными VHH в качестве модулей, узнающих BCMA (cilta-cel), эффективен при терапии пациентов с множественной миеломой [151], а три-специфический CAR на основе трех VHH против CD19, CD22 и BCMA активен в отношении NHL [469], открывает возможности для создания аналогичных биспецифических VHH-CAR против CD19 и CD20. Таким образом, несмотря на субоптимальную активность созданных нами вариантов тандемных биспецифических CAR, их дальнейшая структурная доводка представляется вполне решаемой задачей, а полученные нами dualCAR Т-клетки предстоит протестировать в системах *in vitro* и *in vivo*, моделирующих потерю антигена.

3.6. Выбор альтернативного клеточного носителя для CAR терапии

Альтернативой сложным и затратным технологическим процессам выделения, активации и модификации Т-клеток *ex vivo* может стать использование НК-клеток или НК-клеточных линий в качестве носителя для CAR. CAR НК-клеточная терапия имеет огромный потенциал для терапии как гематоонкологических [470], так и солидных [471] новообразований за счет возможности приготовления готового, “off-the-shelf” клеточного продукта. В отличие от Т-клеток, НК-клетки обладают способностью атаковать опухолевые клетки МНС-независимо и без предварительной антигенной сенсibilизации, что позволяет обойти некоторые ограничения Т-клеточной терапии в этой области, связанные с утратой опухолью МНС-I и дефектами антигенпрезентации [472]. Так, НК-клетки отличаются от Т-клеток по механизмам реализации цитотоксичности и, несмотря на ограниченные возможности проникновения в солидные опухоли [473], могут использоваться для контроля метастазов [474,475] или онкогематологических заболеваний [476] даже без модификации [477]. По состоянию на конец 2025 года терапевтические подходы, основанные на НК-клетках, тестируются в более чем 1200 клинических испытаниях, из которых 160 приходится на CAR НК-клеточную терапию

(ClinicalTrials.gov). Вместе с тем, работа с первичными НК-клетками здоровых доноров является технически сложной, кроме того, их количество в периферической крови в норме невелико [319]. Таким образом, совершенно оправдано использование для этой цели предоблученных НК-клеточных линий [478–480]. Как и первичные НК-клетки, они способны быстро уничтожать опухолевые клетки-мишени, опираясь на баланс сигналов от альтернативной системы рецепторов, и секретировать набор цитокинов, отличный от такового у Т-клеток [321,322]. При этом в них легче доставлять кодирующие CAR каскеты путем трансдукции или трансфекции [323]. Формально такой формат позволяет получать неограниченное количество детально охарактеризованных CAR НК-клеток, облучать их и вводить пациентам при первой необходимости.

3.6.1. Получение CD20-специфических CAR НК-клеточных линий и анализ уровня поверхностной экспрессии рецептора

Для исследования нами были выбраны три НК-клеточные линии: YT, NK-92 [470] и KHYG-1 [481]. Самой известной НК-клеточной линией остается линия NK-92, применение которой в качестве носителя для CAR дошло до стадии клинических испытаний [482]. Для линии KHYG-1 показан высокий уровень цитотоксичности, и она также рассматривается как потенциальное средство для клеточной иммунотерапии. Достоинством клеток линии YT является то, что она не требует добавления IL2 для пролиферации, однако по литературным данным она проявляет достаточно ограниченную цитотоксичность [481]. Кроме того, известно, что в линиях NK-92 и YT детектируются последовательности вируса Эпштейна-Барр, что может накладывать серьезные ограничения на их клиническое использование. Для целей сравнения нами был выбран CD20-специфический CAR второго поколения состава Leu16-IgG1-CD28-CD3 ζ , получены лентивирусные частицы и трансдуцированы клетки всех трех линий. Для обеспечения гомогенности CAR НК-клеточных продуктов и нормализации уровней поверхностной экспрессии CAR, трансдуцированные клетки были отсортированы при помощи клеточного сортера и использованы в дальнейших экспериментах (рис. 26).

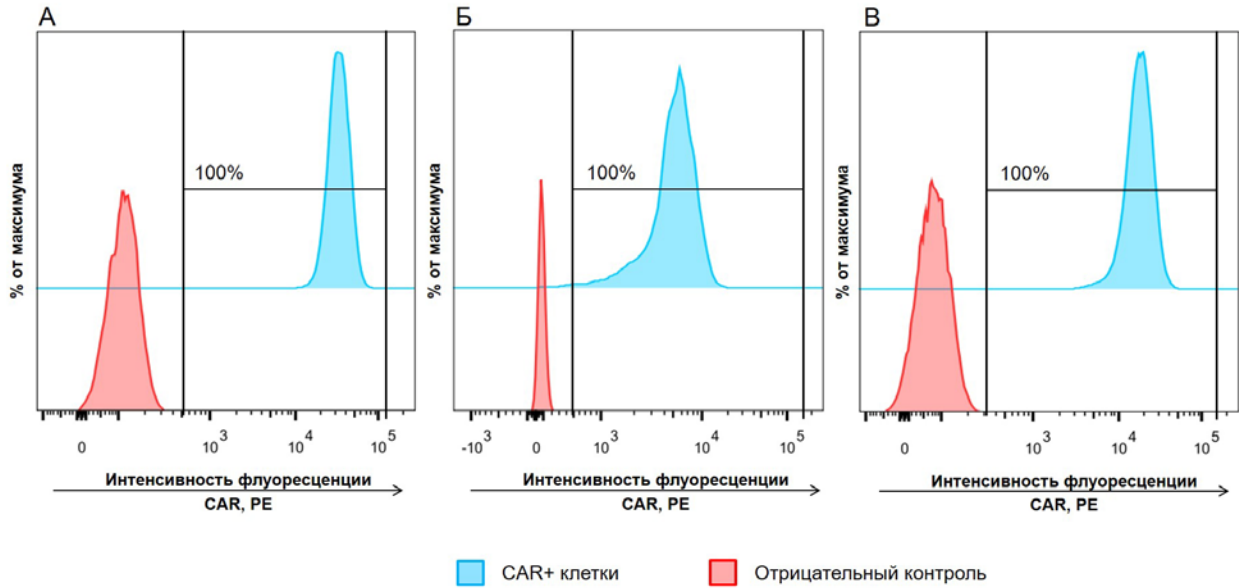


Рисунок 26. NK-клеточные линии YT (A), KHYG-1 (Б) и NK-92 (B) экспрессируют CD20-специфический CAR (окрашивание клеток конъюгатами анти-с-тус/PE, проточная цитометрия).

3.6.2. Полученные CD20-специфические CAR NK-клеточные линии функциональны в тестах *in vitro*

Одной из проблем при характеристике NK-клеток или NK-клеточных линий *in vitro* является отсутствие опухолевых клеточных линий, исходно устойчивых к данным клеткам, что значительно осложняет оценку неспецифической и CAR-опосредованной цитотоксичности. Для преодоления этой проблемы в качестве клеток-мишеней была использована модельная клеточная линия HEK293T с поверхностной экспрессией CD20 (HEK293T-CD20). Клетки этой линии не являются опухолевыми, экспрессируют молекулы HLA и соответственно более устойчивы к фоновому лизису NK-клеточными линиями. Полученные данные свидетельствуют о том, что все CAR NK-клеточные линии обладают CAR-опосредованной специфичностью к CD20, при этом в отличие от CAR YT, клетки линий CAR NK-92 и CAR KHYG-1 более активно уничтожают клетки-мишени при высоких соотношениях эффектор:мишень (E:T) (рис. 27).

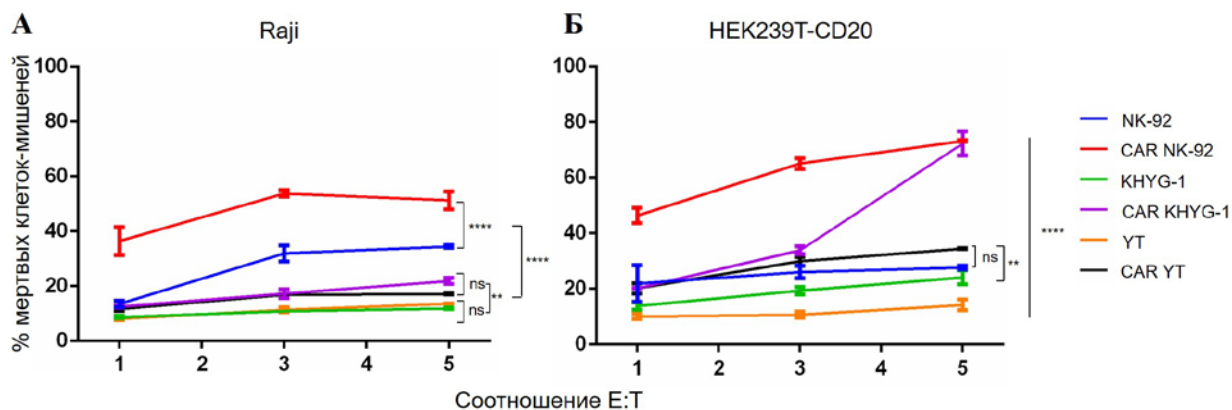


Рисунок 27. Уровень цитотоксической активности CAR NK-клеточных линий и NK-клеточных линий против клеток-мишеней линии Raji (А) и HEK293T-CD20 (Б) в различных соотношениях E:T. Показаны средние значения количества клеток с указанием диапазона. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA, n=3, GraphPad Prism, v6, ns – не достоверно, ** – p<0,01, **** – p < 0,001).

3.6.3. Полученные CD20-специфические CAR NK-клеточные линии достоверно увеличивают продолжительность жизни мышей линии *NOD/Scid* с ксенотрансплантированной опухолью

Поскольку наличие CAR-опосредованной цитотоксичности, проявляемой CAR NK-клеточными линиями *in vitro*, не гарантирует стойкого противоопухолевого эффекта *in vivo*, было решено использовать систему ксенотрансплантации опухолевых клеток человека иммунодефицитным мышам. При этом однако, необходимо помнить, что сами NK-клеточные линии также являются по сути опухолевыми. Соответственно, во избежание приживания CAR NK-клеточных линий как в организме иммунодефицитных мышей, так и у онкологических пациентов необходимо проводить облучение клеток-эффекторов перед введением, что ограничит их возможность к делению. Это принципиальное отличие данной платформы от аутологических CAR Т-клеток, которые многократно делятся в организме пациента после активации. В большинстве клинических испытаний CAR NK-клеточных продуктов эта проблема решается введением большой дозы (до $10^{10}/m^2$) либо многократными введениями [470,482]. Для проверки полученных CAR NK-клеточных линий *in vivo* в модели ксенотрансплантированной опухоли были выбраны клетки линии Raji-luc, любезно предоставленной д.б.н. Степановым А. В. (ИБХ РАН), которые экспрессируют CD20 на физиологическом уровне и дополнительно модифицированы для стабильной экспрессии люциферазы светлячка (fluc) [182], что позволяет проводить прижизненную визуализацию опухолевой нагрузки с помощью прибора IVIS Spectrum (Perkin Elmer).

В эксперименте 6-10 недельным мышам линии *NOD/Scid* внутривенно вводили по 5×10^5 опухолевых клеток Raji-*fluc*, после чего их рандомизировали, разбивали на группы по восемь животных и на 5, 11 и 16 сутки вводили по 5×10^6 предварительно облученных дозой 10 Гр CAR НК-клеточных линий. Контрольная группа в качестве терапии получала инъекции PBS. Далее оценивали общую выживаемость и проводили визуализацию (рис. 28а). В данном эксперименте не было выявлено никаких отличий от отрицательного контроля для групп CAR YТ и CAR NK-92, хотя CAR NK-92 продемонстрировали тенденцию к контролю опухоли. Тем не менее, клетки линии CAR KHYG-1 достоверно увеличили время жизни животных с ксенотрансплантированной опухолью (рис. 28б, в).

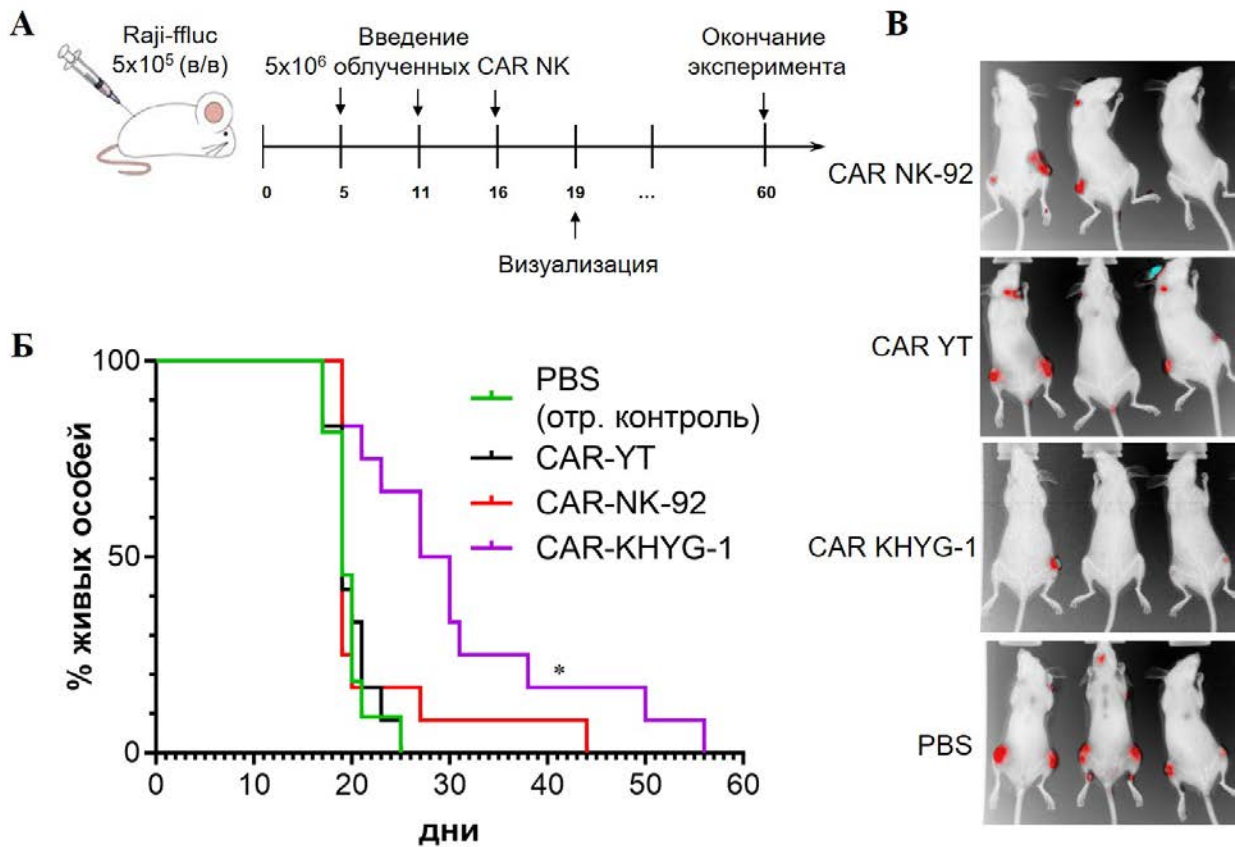


Рисунок 28. А – Схема эксперимента. Б – Введение клеточного продукта CAR-KHYG-1 приводит к увеличению продолжительности жизни мышей с ксенотрансплантированной опухолью Raji-*fluc* и достоверно увеличивает выживаемость в эксперименте *in vivo* в сравнении с отрицательным контролем. Статистический анализ был выполнен с использованием метода Каплана-Майера с последующим логарифмическим ранговым тестом (тест Манталя-Кокса) (в каждой группе было 12 животных, GraphPad Prism, v6, * – $p < 0,05$). В – Прижизненная визуализация ксенотрансплантированных клеток линии Raji-*fluc* на 19 день эксперимента.

Хотя NK-92 остается наиболее часто используемой в клинических испытаниях НК-клеточной линией [483], остается открытым вопрос, связано ли это с наилучшими свойствами

данной линии. С нашей точки зрения клеточная линия KHYG-1 является не менее перспективной платформой для потенциального терапевтического применения “off-the-shelf” продукта. Кроме выбора клеточного носителя для CAR, опосредующего цитотоксичность по отношению к клетка-мишеням, перспективным, но малоизученным направлением все еще остается оптимизация структуры рецептора. В контексте NK-клеток рутинно используются CAR, созданные для T-клеток. В то же время, сигнальные пути для этих клеток различаются и, возможно, замена и/или добавление специфичных для NK-клеток сигнальных последовательностей улучшит результаты такой терапии. В настоящее время встречаются работы по замене сигнальных доменов на сигнальные районы от CD16, NKp44, NKp46 и NKG2D, а также добавление костимулирующих последовательностей, таких как DNAM1 [484], 2B4 [485], DAP10, DAP12 [486] или 4-1BB, как по отдельности, так и в сочетании с CD3 ζ .

Таким образом, для преодоления существующих барьеров и успешного применения CAR NK-клеточной терапии в реальной клинической практике необходимо решить две отдельные проблемы. В первую очередь, подобрать источник NK-клеток, который будет относительно легко доступен, чтобы иметь возможность масштабировать производство таких клеток и безопасно использовать. Во-вторых, оптимизировать структуру CAR-кассеты, а именно доменного состава CAR, так и дополнительных последовательностей, для того чтобы увеличить время персистенции и устойчивость к неблагоприятным условиям, особенно в контексте солидных опухолей [259,487].

3.7. Возможности для получения “усиленных” CAR клеток

Кроме оптимизации структуры для CAR NK-клеточной терапии, создание “усиленных” CAR T-клеток, секретирующих дополнительные молекулы, такие как цитокины, хемокины, антитела, ViTE и ингибиторы контрольных точек, или несущих дополнительные инженерные модули, повышающие устойчивость к иммуносупрессии (например, инвертированные цитокиновые рецепторы), меняющие опухолевое микроокружение и метаболические пути и увеличивающие хоминг к опухоли [488,489] является крайне актуальным направлением исследований. Использование таких подходов потенциально может помочь преодолеть иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, привлекать дополнительные звенья иммунной системы пациента и увеличить персистенцию CAR T/NK-клеток.

Было показано, что конститутивная экспрессия таких “полезных” молекул может или исказить фенотип получаемых CAR/TCR T-/NK-клеток, или увеличивать риски системной токсичности [490–492], в связи с чем создание модулей, обеспечивающих экспрессию подобных молекул вследствие CAR-опосредованной активации, продолжает оставаться актуальной задачей. Такой подход потенциально позволит адресно доставлять целевые молекулы, достигать

высокой локальной концентрации и снизить общую токсичность, возникающую при применении “усиленных” CAR T-/NK-клеток [493]. Согласно существующим литературным данным, наиболее часто при работе с T- и B-клетками в качестве индуцируемых активацией промоторов используются мультимеры сайтов связывания NFkB и NFAT. Однако относительно мало известно о функциональности таких последовательностей в контексте NK-клеток. Для такого исследования было проведено сравнение функциональности нескольких промоторов, индуцируемых активацией, в первичных T-клетках человека, а также в линиях NK-клеток NK-92 и YT.

Для сравнения различных вариантов индуцибельных промоторов были получены лентивирусные конструкции, схематично изображенные на рисунке 29а. Для этого в исходном векторе SIN (pCDH, CD530, SystemBio, США) последовательность CMV была заменена на комбинацию “промотор-mCherry” в инвертированной ориентации, для исключения остаточной транскрипции с 5'-LTR вектора в отсутствие активирующих условий [494,495]. В качестве контролей использовали конструкцию, не несущую никакого промотора и конструкцию, несущую человеческий конститутивный промотор PGK. Для возможности нормировать уровень экспрессии репортёра mCherry во всех конструкциях присутствовала последовательность copGFP под контролем конститутивного промотора *EF1a* (рис. 29а).

Первичные T-клетки человека, а также NK-клеточные линии NK-92 и YT были трансдуцированы при помощи данных лентивирусных частиц. Предварительно NK-клеточные линии были модифицированы для стабильной экспрессии CAR второго поколения [496] таким образом, чтобы было возможно сопоставить их активацию в контексте CAR-опосредованной активации вне зависимости от различий в экспрессии активирующих и ингибирующих рецепторов, а также в сигнальных путях. При анализе клеток проточной цитометрией для селекции и нормировки использовали уровень экспрессии copGFP в трансдуцированных клетках.

T-клетки активировали CD3-CD28 активационными частицами, а для активации клеток CAR-YT и CAR-NK-92 их прединкубировали с клетками-мишенями. Уровень флуоресценции mCherry, нормализованный на флуоресценцию copGFP, измеряли в покоящихся и активированных клетках для количественной оценки относительной активности и кратности индукции использованных промоторов. Как в первичных T-клетках, так и в клетках CAR-NK-92 наиболее высокий уровень экспрессии mCherry после активации был обнаружен с использованием промотора 30xNFkB. Примечательно, что этот промотор также продемонстрировал самую высокую фоновую экспрессию mCherry в отсутствие активации с примерно двукратным уровнем индукции (рис. 29б). Промотор 10xNFkB был в целом аналогичен и показал несколько сниженный уровень экспрессии. Элемент 5xNFkB был значительно слабее,

а 2xNFkB демонстрировал лишь небольшую промоторную активность. Репортёрная экспрессия с промотора 4xNFAT была очень сдержанной, но при этом обеспечивала значимую кратность индукции в первичных Т-клетках, в отличие от клеток CAR-NK-92, где он не проявлял активности. Несмотря на выраженную активацию клеток, судя по секреции IFN γ и поверхностной экспрессии маркера дегрануляции CD107a [497], ни один из протестированных промоторов не был активен в CAR-YT клетках (данные не показаны).

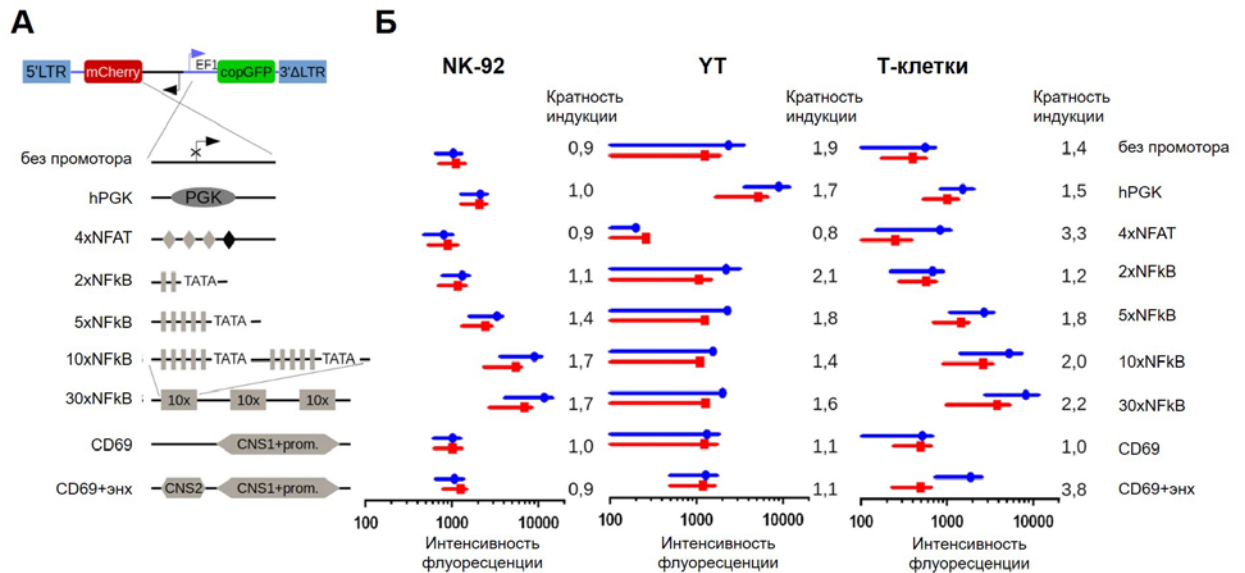


Рисунок 29. Анализ хромосомно-интегрированных промоторов, индуцированных активацией, в CAR NK-92, CAR YT и Т-клетках. А – Схема лентивирусного вектора для проверки различных вариантов индуцибельных промоторов, Б – Нормализованные на sorGFP значения флуоресценции репортёра mCherry в клетках CAR NK-92 и CAR YT, коинкубированных с клетками-мишенями НЕК293Т-PSМА (синий) или изогенными контролями (НЕК293Т, красный). Точно так же показаны значения, наблюдаемые для активированных частицами (синий) и покоящихся (красный) Т-клеток. Показаны средние значения интенсивности флуоресценции с указанием диапазона.

Белок CD69 является маркером ранней активации В-, Т- и NK-клеток [498,499], соответственно, промоторные/энхансерные последовательности гена, кодирующего данный белок, могут играть роль индуцибельных промоторов. Ранее группой под руководством П. Лозурика были найдены 4 высококонсервативные некодирующие последовательности ДНК CNS1–4 [500], находящиеся рядом с промоторной областью гена *CD69*. Проанализировав доступные данные ChIP-seq анализа [501,502], был выбран район в области 5 т.п.н. выше гена *CD69* человека. Были созданы два репортёра, под контролем элементов CNS1 + промотора или CNS2 + CNS1 + промотора, которые были доставлены в первичные Т-клетки человека и клеточные линии CAR-NK. Как и ожидалось, минимальный промотор *CD69* в сочетании с элементом CNS1 не проявлял промоторной активности ни в первичных Т-клетках человека, ни в клеточных линиях CAR-NK (рис. 296), а добавление элемента CNS2 превращало такую

конструкцию в индуцируемой активацией репортёр с более высоким соотношением экспрессии «сигнал/шум», хотя этот эффект был ограничен первичными Т-клетками человека.

Для CAR NK-клеточных линий YT и NK-92 не было обнаружено ни одного промотора, обеспечивающего желаемую комбинацию высокой кратности индукции и низкой фоновой экспрессии. Такие результаты являются неожиданными, однако могут быть связаны отличиями в сигнальных путях, задействованных в этих клетках [503]. Кроме того, необходимо отметить, что полученные нами данные о низком соотношении сигнал/фон для протестированных нами индуцируемых промоторов находятся в полном соответствии с более поздними наблюдениями группы Д. Пауэлла [492] и, по всей видимости, связаны с тем фактом, что конститутивный промотор *EF1a* является двунаправленным [504,505], тем самым создавая ощутимый уровень "подтекания" тестируемых промоторов в отсутствие активации.

Из полученных данных необходимо сделать два важных вывода: 1) при создании и тестировании активационно-индуцируемых кассет необходимо более полно контролировать возможное влияние соседних промоторных элементов, например, располагая их в другой ориентации/последовательно или добавляя инсуляторные последовательности; 2) в будущем для дизайна активационно-индуцируемых модулей стоит включать синтетические/искусственные последовательности, как это уже было реализовано в нескольких пилотных работах [506,507], и использовать непредвзятые библиотечные скрининги.

3.8. Заключение

Полученные в данной работе результаты демонстрируют перспективность использования вновь созданных химерных антигенных рецепторов для потенциальной терапии онкогематологических заболеваний. Показано, что все созданные CD20-специфичные CAR в моноспецифичном формате не уступают референсному CD19-специфичному CAR *in vitro* и *in vivo*. Создана технологическая платформа для проверки вариантов клеточной терапии на животных моделях с использованием прижизненной визуализации, основанной на люминометрии. Показан потенциал и нюансы создания биспецифичных CAR для расширения репертуара специфичности CAR Т-клеточной терапии, а также использования NK-клеточных линий для аллогенного формата использования CAR-терапии. Полученные данные дополняют уже существующие результаты и могут быть использованы для дальнейших клинических испытаний. На основе полученных результатов сформулированы следующие выводы.

ГЛАВА 4. ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что CD20-специфичные CAR T-клетки проявляют цитотоксичность в отношении В-клеточных мишеней *in vitro* и обеспечивают выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* на модели ксенотрансплантированной опухоли острого лимфобластного лейкоза Nalm6-CD20.
2. Установлено, что биолюминесцентная система на основе комбинации люциферазы NanoLuc и h-целентеразина обладает высокой чувствительностью *in vitro* и *in vivo* и позволяет проводить количественное определение и исследовать биораспределение опухолевых клеток в лабораторных животных.
3. Биспецифические анти-CD19/CD20 клетки, экспрессирующие два независимых CAR, активно уничтожают клетки-мишени *in vitro*, причем как в условиях проявления краткосрочной цитотоксичности, так и в условиях хронической антигенной стимуляции.
4. Впервые полученная CAR-KHYG-1 НК-клеточная линия, специфичная к CD20, обеспечивает длительный противоопухолевый контроль и достоверно увеличивает продолжительность жизни мышей с ксенотрансплантированными клетками лимфомы Беркитта Raji-ffluc по сравнению с клеточными линиями CAR-NK-92 и CAR-YT.
5. Установлено, что использование минимального промотора гена *CD69* человека в сочетании с энхансерами CNS1 и CNS2 позволяет добиться индуцируемой экспрессии целевого гена в первичных Т-клетках.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kantarjian, H. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: 2025 Update on Diagnosis, Therapy, and Monitoring // *Am. J. Hematol.* — 2025. — Vol. 100. — P. 1205–1231. — doi: 10.1002/ajh.27708.
2. Martínez-Gamboa, D. A. [et al.] CAR T-cell therapy landscape in pediatric, adolescent and young adult oncology - A comprehensive analysis of clinical trials // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* — 2025. — Vol. 209. — Art. 104648. — doi: 10.1016/j.critrevonc.2025.104648.
3. Sasaki, K. [et al.] Acute lymphoblastic leukemia: A population-based study of outcome in the United States based on the SEER database, 1980-2017 // *Am. J. Hematol.* — 2021. — Vol. 96. — P. 650–658. — doi: 10.1002/ajh.26156.
4. Grupp, S. A. [et al.] Durable Remissions in Children with Relapsed/Refractory ALL Treated with T Cells Engineered with a CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CTL019) // *Blood.* — 2015. — Vol. 126. — P. 681–681. — doi: 10.1182/blood.V126.23.681.681.
5. Maude, S. L. [et al.] Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2014. — Vol. 371. — P. 1507–1517. — doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
6. Gardner, R. A. [et al.] Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults // *Blood.* — 2017. — Vol. 129. — P. 3322–3331. — doi: 10.1182/blood-2017-02-769208.
7. Park, J. H. [et al.] Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2018. — Vol. 378. — P. 449–459. — doi: 10.1056/NEJMoa1709919.
8. Maude, S. L. [et al.] Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2018. — Vol. 378. — P. 439–448. — doi: 10.1056/NEJMoa1709866.
9. Sotillo, E. [et al.] Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy // *Cancer Discov.* — 2015. — Vol. 5. — P. 1282–1295. — doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
10. Mitra, A. [et al.] From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy // *Front. Immunol.* — 2023. — Vol. 14. — Art. 1188049. — doi: 10.3389/fimmu.2023.1188049.
11. Shadman, M. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A review // *JAMA.* — 2023. — Vol. 329. — P. 918–932. — doi: 10.1001/jama.2023.1946.
12. Hunger, S. P. [et al.] Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group // *J. Clin. Oncol.* — 2012. — Vol. 30. — P. 1663–1669. — doi: 10.1200/JCO.2011.37.8018.
13. Hunger, S. P. [et al.] Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia // *Pediatr. Blood Cancer.* — 2013. — Vol. 60. — P. 957–963. — doi: 10.1002/pbc.24420.
14. Bhojwani, D. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia / D. Bhojwani, C.-H. Pui // *Lancet Oncol.* — 2013. — Vol. 14. — P. e205–e217. — doi: 10.1016/S1470-2045(12)70580-6.

15. Forman, S. J. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult / S. J. Forman, J. M. Rowe // *Blood*. — 2013. — Vol. 121. — P. 1077–1082. — doi: 10.1182/blood-2012-08-234492.
16. Oriol, A. [et al.] Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group // *Haematologica*. — 2010. — Vol. 95. — P. 589–596. — doi: 10.3324/haematol.2009.014274.
17. Schrappe, M. [et al.] Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2012. — Vol. 366. — P. 1371–1381. — doi: 10.1056/NEJMoa1110169.
18. Wang, S. S. Epidemiology and etiology of diffuse large B-cell lymphoma // *Semin. Hematol.* — 2023. — Vol. 60. — P. 255–266. — doi: 10.1053/j.seminhematol.2023.11.004.
19. Momotow, J. [et al.] Hodgkin Lymphoma-Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients // *J. Clin. Med.* — 2021. — Vol. 10. — Art. 1125. — doi: 10.3390/jcm10051125.
20. Chu, Y. [et al.] The epidemiological patterns of non-Hodgkin lymphoma: global estimates of disease burden, risk factors, and temporal trends // *Front. Oncol.* — 2023. — Vol. 13. — Art. 1059914. — doi: 10.3389/fonc.2023.1059914.
21. Singh, D. [et al.] Global patterns of Hodgkin lymphoma incidence and mortality in 2020 and a prediction of the future burden in 2040 // *Int. J. Cancer*. — 2022. — Vol. 150. — P. 1941–1947. — doi: 10.1002/ijc.33948.
22. Crump, M. [et al.] Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study // *Blood*. — 2017. — Vol. 130. — P. 1800–1808. — doi: 10.1182/blood-2017-03-769620.
23. Padala, S. A. Diffuse Large B-Cell Lymphoma [Electronic resource] / S. A. Padala, A. Kallam // *StatPearls*. — Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2026. — URL: nih.gov (дата обращения: 02.04.2026).
24. Tomás, J. F. The challenge of recurrent follicular lymphoma // *Lancet Oncol.* — 2011. — Vol. 12. — P. 714–716. — doi: 10.1016/S1470-2045(11)70181-4.
25. Avivi, I. Refining the mantle cell lymphoma paradigm: impact of novel therapies on current practice / I. Avivi, A. Goy // *Clin. Cancer Res.* — 2015. — Vol. 21. — P. 3853–3861. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0488.
26. Intragumtornchai, T. [et al.] Non-Hodgkin lymphoma in South East Asia: An analysis of the histopathology, clinical features, and survival from Thailand // *Hematol. Oncol.* — 2018. — Vol. 36. — P. 28–36. — doi: 10.1002/hon.2392.
27. Shaffer, A. L. Pathogenesis of human B cell lymphomas / A. L. Shaffer, R. M. Young, L. M. Staudt // *Annu. Rev. Immunol.* — 2012. — Vol. 30. — P. 565–610. — doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075027.
28. Kaplan, L. D. HIV-associated lymphoma // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* — 2012. — Vol. 25. — P. 101–117. — doi: 10.1016/j.beha.2012.01.001.

29. Shannon-Lowe, C. Epstein-Barr virus-associated lymphomas / C. Shannon-Lowe, A. B. Rickinson, A. I. Bell // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* — 2017. — Vol. 372. — Art. 20160271. — doi: 10.1098/rstb.2016.0271.
30. Malpica, L. [et al.] EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2024 update on the diagnosis, risk-stratification, and management // *Am. J. Hematol.* — 2024. — Vol. 99. — P. 2002–2015. — doi: 10.1002/ajh.27430.
31. Liu, C.-Y. Primary Effusion Lymphoma: A Timely Review on the Association with HIV, HHV8, and EBV / C.-Y. Liu, B.-J. Chen, S.-S. Chuang // *Diagnostics (Basel)*. — 2022. — Vol. 12. — Art. 0713. — doi: 10.3390/diagnostics12030713.
32. Berhan, A. HIV/AIDS associated lymphoma: review / A. Berhan, B. Bayleyegn, Z. Getaneh // *Blood Lymphat. Cancer*. — 2022. — Vol. 12. — P. 31–45. — doi: 10.2147/BLCTT.S361320.
33. Coiffier, B. [et al.] Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients // *Blood*. — 2010. — Vol. 116. — P. 2040–2045. — doi: 10.1182/blood-2010-03-276246.
34. Diffuse Large B-Cell Lymphoma — Cancer Stat Facts [Electronic resource] // SEER. — URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/dlbcl.html> (дата обращения: 09.03.2026).
35. Zanwar, S. Current risk stratification and staging of multiple myeloma and related clonal plasma cell disorders / S. Zanwar, S. V. Rajkumar // *Leukemia*. — 2025. — Vol. 39. — P. 2610–2617. — doi: 10.1038/s41375-025-02654-y.
36. Rajkumar, S. V. Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management // *Am. J. Hematol.* — 2024. — Vol. 99. — P. 1802–1824. — doi: 10.1002/ajh.27422.
37. Fielding, A. K. [et al.] Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study // *Blood*. — 2007. — Vol. 109. — P. 944–950. — doi: 10.1182/blood-2006-05-018192.
38. Navas-Acosta, J. [et al.] Preferential Genetic Pathways Lead to Relapses in Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia // *Cancers (Basel)*. — 2024. — Vol. 16. — Art. 4200. — doi: 10.3390/cancers16244200.
39. Chen, X. [et al.] Pediatric acute lymphoblastic leukemia relapse and prognosis: key predictors and therapeutic implications // *Front. Pediatr.* — 2025. — Vol. 13. — Art. 1710578. — doi: 10.3389/fped.2025.1710578.
40. Kim, H. [et al.] Clinical outcome of relapsed or refractory burkitt lymphoma and mature B-cell lymphoblastic leukemia in children and adolescents // *Cancer Res. Treat.* — 2014. — Vol. 46. — P. 358–365. — doi: 10.4143/crt.2013.047.
41. Jakobsen, L. H. [et al.] Minimal relapse risk and early normalization of survival for patients with Burkitt lymphoma treated with intensive immunochemotherapy: an international study of 264 real-world patients // *Br. J. Haematol.* — 2020. — Vol. 189. — P. 661–671. — doi: 10.1111/bjh.16425.
42. Poletto, S. [et al.] Treatment strategies for patients with diffuse large B-cell lymphoma // *Cancer Treat. Rev.* — 2022. — Vol. 110. — Art. 102443. — doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102443.

43. Fischer, K. [et al.] Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial // *Blood*. — 2016. — Vol. 127. — P. 208–215. — doi: 10.1182/blood-2015-06-651125.
44. Richter, J. [et al.] Real-world multiple myeloma front-line treatment and outcomes by transplant in the United States // *eJHaem*. — 2023. — Vol. 4. — P. 984–994. — doi: 10.1002/jha2.739.
45. Zeng, X. L. [et al.] Role of B Cell Recovery in Relapse Risk and CD19 Phenotype Following Real-World Use of Tisagenlecleucel for Pediatric B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Multi-Institutional Retrospective Study // *Blood*. — 2024. — Vol. 144. — P. 2817–2817. — doi: 10.1182/blood-2024-211231.
46. Laetsch, T. W. [et al.] Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial // *J. Clin. Oncol.* — 2023. — Vol. 41. — P. 1664–1669. — doi: 10.1200/JCO.22.00642.
47. Molinos-Quintana, Á. [et al.] Impact of disease burden and late loss of B cell aplasia on the risk of relapse after CD19 chimeric antigen receptor T Cell (Tisagenlecleucel) infusion in pediatric and young adult patients // *Front. Immunol.* — 2023. — Vol. 14. — Art. 1280580. — doi: 10.3389/fimmu.2023.1280580.
48. Ramos, C. A. CAR-T Cell Therapy for Lymphoma / C. A. Ramos, H. E. Heslop, M. K. Brenner // *Annu. Rev. Med.* — 2016. — Vol. 67. — P. 165–183. — doi: 10.1146/annurev-med-051914-021702.
49. Kriegsmann, K. [et al.] Cell-based immunotherapy approaches for multiple myeloma // *Br. J. Cancer*. — 2019. — Vol. 120. — P. 38–44. — doi: 10.1038/s41416-018-0346-9.
50. Ormhøj, M. [et al.] Cars in the lead against multiple myeloma // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* — 2017. — Vol. 12. — P. 119–125. — doi: 10.1007/s11899-017-0373-2.
51. Krumbholz, M. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy / M. Krumbholz, T. Derfuss, R. Hohlfeld, E. Meinl // *Nat. Rev. Neurol.* — 2012. — Vol. 8. — P. 613–623. — doi: 10.1038/nrneurol.2012.203.
52. Poorebrahim, M. [et al.] Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* — 2019. — Vol. 56. — P. 393–419. — doi: 10.1080/10408363.2019.1633512.
53. Labbé, R. P. Lentiviral vectors for T cell engineering: clinical applications, bioprocessing and future perspectives / R. P. Labbé, S. Vessillier, Q. A. Rafiq // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13. — Art. 1528. — doi: 10.3390/v13081528.
54. Yin, H. The design of retroviral vectors used in the CAR-T products, risk management, and future perspective / H. Yin, X. Wei // *MedComm*. — 2025. — Vol. 6. — Art. e70067. — doi: 10.1002/mco2.70067.
55. Stock, S. [et al.] Retrovirus-based manufacturing of chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer therapy research // *Methods Cell Biol.* — 2025. — Vol. 191. — P. 329–352. — doi: 10.1016/bs.mcb.2024.10.017.
56. Magnani, C. F. [et al.] Transposon-Based CAR T Cells in Acute Leukemias: Where are We Going? // *Cells*. — 2020. — Vol. 9. — Art. 1337. — doi: 10.3390/cells9061337.

57. Gehrke, L. [et al.] Current Non-Viral-Based Strategies to Manufacture CAR-T Cells // *Int. J. Mol. Sci.* — 2024. — Vol. 25. — Art. 13685. — doi: 10.3390/ijms252413685.
58. Brentjens, R. J. [et al.] Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13. — P. 5426–5435. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0674.
59. Brentjens, R. J. [et al.] CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia // *Sci. Transl. Med.* — 2013. — Vol. 5. — Art. 177ra38. — doi: 10.1126/scitranslmed.3005930.
60. Lee, D. W. [et al.] T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial // *Lancet.* — 2015. — Vol. 385. — P. 517–528. — doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
61. Yan, Z. [et al.] A phase 1 study of LY007, a novel anti-CD20 CAR-T cell therapy in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma // *JCO.* — 2024. — Vol. 42. — Art. 7027. — doi: 10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.7027.
62. Li, P. [et al.] C-CAR066, a novel fully human anti-CD20 CAR-T therapy for relapsed or refractory large B-cell lymphoma after failure of anti-CD19 CAR-T therapy: A phase I clinical study // *Am. J. Hematol.* — 2024. — Vol. 99. — P. 2306–2312. — doi: 10.1002/ajh.27488.
63. Frank, M. J. [et al.] CD22-directed CAR T-cell therapy for large B-cell lymphomas progressing after CD19-directed CAR T-cell therapy: a dose-finding phase 1 study // *Lancet.* — 2024. — Vol. 404. — P. 353–363. — doi: 10.1016/S0140-6736(24)00746-3.
64. Srinagesh, H. [et al.] CD22-directed CAR-T cells induce complete remissions in high-risk follicular and Mantle Cell Lymphoma with limited neurotoxicity // *Blood.* — 2025. — Vol. 146. — Art. 4159. — doi: 10.1182/blood-2025-4159.
65. Tettamanti, S. [et al.] Lenalidomide enhances CD23.CAR T cell therapy in chronic lymphocytic leukemia // *Leuk. Lymphoma.* — 2022. — Vol. 63. — P. 1566–1579. — doi: 10.1080/10428194.2022.2043299.
66. Ramos, C. A. [et al.] Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma // *J. Clin. Oncol.* — 2020. — Vol. 38. — P. 3794–3804. — doi: 10.1200/JCO.20.01342.
67. Neelapu, S. S. [et al.] Five-year follow-up of ZUMA-1 supports the curative potential of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma // *Blood.* — 2023. — Vol. 141. — P. 2307–2315. — doi: 10.1182/blood.2022018893.
68. Bergsagel, P. L. [et al.] In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain // *Blood.* — 1995. — Vol. 85. — P. 436–447. — doi: 10.1182/blood.V85.2.436.436.
69. Nerreter, T. [et al.] Super-resolution microscopy reveals ultra-low CD19 expression on myeloma cells that triggers elimination by CD19 CAR-T // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10. — Art. 3137. — doi: 10.1038/s41467-019-10948-w.

70. Hansen, D. K. [et al.] Idecabtagene Vicleucel for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Real-World Experience From the Myeloma CAR T Consortium // *J. Clin. Oncol.* — 2023. — Vol. 41. — P. 2087–2097. — doi: 10.1200/JCO.22.01365.
71. Kamboj, I. [et al.] Real-World Efficacy Outcomes of Ciltacabtagene Autoleucel in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Comparative Study with the Cartitude-1 Trial // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* — 2026. — Vol. 26. — P. e315–e324. — doi: 10.1016/j.clml.2025.09.015.
72. Da Vià, M. C. [et al.] Homozygous BCMA gene deletion in response to anti-BCMA CAR T cells in a patient with multiple myeloma // *Nat. Med.* — 2021. — Vol. 27. — P. 616–619. — doi: 10.1038/s41591-021-01245-5.
73. Camviel, N. [et al.] Both APRIL and antibody-fragment-based CAR T cells for myeloma induce BCMA downmodulation by trogocytosis and internalization // *J. Immunother. Cancer.* — 2022. — Vol. 10. — Art. 005091. — doi: 10.1136/jitc-2022-005091.
74. Ledergor, G. [et al.] CD4+ CAR T-cell exhaustion associated with early relapse of multiple myeloma after BCMA CAR T-cell therapy // *Blood Adv.* — 2024. — Vol. 8. — P. 3562–3575. — doi: 10.1182/bloodadvances.2023012416.
75. Ansari, M. S. [et al.] AI-guided CAR designs and targeted pathway modulation to enhance multi-antigen CAR T cell durability and overcome antigen escape // *Nat. Commun.* — 2026. — Vol. 17. — Art. 1549. — doi: 10.1038/s41467-025-68272-5.
76. Shah, N. N. [et al.] Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial // *Nat. Med.* — 2020. — Vol. 26. — P. 1569–1575. — doi: 10.1038/s41591-020-1081-3.
77. Larson, S. M. [et al.] CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptor (CAR) in Naïve/Memory T Cells for the Treatment of Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma // *medRxiv.* — 2022. — doi: 10.1101/2022.02.10.22270792.
78. Wang, S. [et al.] Abstract 3173: JL-lightning CAR-T, a next generation non-viral CAR-T without in-vitro culturing procedure // *Cancer Res.* — 2025. — Vol. 85. — Art. 3173. — doi: 10.1158/1538-7445.AM2025-3173.
79. Bagashev, A. [et al.] CD19 Alterations Emerging after CD19-Directed Immunotherapy Cause Retention of the Misfolded Protein in the Endoplasmic Reticulum // *Mol. Cell. Biol.* — 2018. — Vol. 38. — Art. 00383-18. — doi: 10.1128/MCB.00383-18.
80. Fraietta, J. A. [et al.] Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia // *Nat. Med.* — 2018. — Vol. 24. — P. 563–571. — doi: 10.1038/s41591-018-0010-1.
81. Aparicio-Pérez, C. Failure of ALL recognition by CAR T cells: a review of CD 19-negative relapses after anti-CD 19 CAR-T treatment in B-ALL / C. Aparicio-Pérez, Md. Carmona, K. Benabdellah, C. Herrera // *Front. Immunol.* — 2023. — Vol. 14. — Art. 1165870. — doi: 10.3389/fimmu.2023.1165870.

82. Xu, X. [et al.] Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies // *Front. Immunol.* — 2019. — Vol. 10. — Art. 2664. — doi: 10.3389/fimmu.2019.02664.
83. Till, B. G. [et al.] CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results // *Blood.* — 2012. — Vol. 119. — P. 3940–3950. — doi: 10.1182/blood-2011-10-387969.
84. Czuczman, M. S. [et al.] Acquirement of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation // *Clin. Cancer Res.* — 2008. — Vol. 14. — P. 1561–1570. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1254.
85. Beers, S. A. [et al.] Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection // *Blood.* — 2010. — Vol. 115. — P. 5191–5201. — doi: 10.1182/blood-2010-01-263533.
86. Lim, S. H. [et al.] Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy // *Blood.* — 2011. — Vol. 118. — P. 2530–2540. — doi: 10.1182/blood-2011-01-330357.
87. Fogliatto, L. [et al.] Promising efficacy of BI-1206, an antibody targeting FcγRIIB in combination with rituximab and acalabrutinib in R/R NHL patients NHL // *Blood.* — 2025. — Vol. 146. — Art. 5349. — doi: 10.1182/blood-2025-5349.
88. Terui, Y. [et al.] Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15. — P. 2523–2530. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1403.
89. Henry, C. [et al.] Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance // *Blood.* — 2010. — Vol. 115. — P. 2420–2429. — doi: 10.1182/blood-2009-06-229112.
90. Ang, Z. [et al.] Alternative splicing of its 5'-UTR limits CD20 mRNA translation and enables resistance to CD20-directed immunotherapies // *Blood.* — 2023. — Vol. 142. — P. 1724–1739. — doi: 10.1182/blood.2023020400.
91. Gamonet, C. [et al.] New CD20 alternative splice variants: molecular identification and differential expression within hematological B cell malignancies // *Exp. Hematol. Oncol.* — 2015. — Vol. 5. — Art. 7. — doi: 10.1186/s40164-016-0036-3.
92. Kennedy, A. D. [et al.] Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — P. 3280–3288. — doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3280.
93. Aung, T. [et al.] Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — Vol. 108. — P. 15336–15341. — doi: 10.1073/pnas.1102855108.
94. Jazirehi, A. R. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy / A. R. Jazirehi, M. I. Vega, B. Bonavida // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 1270–1281. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2184.

95. Takei, K. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines / K. Takei, T. Yamazaki, U. Sawada [et al.] // *Leuk. Res.* — 2006. — Vol. 30. — P. 625–631. — doi: 10.1016/j.leukres.2005.09.008.
96. Terui, Y. [et al.] Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab // *Cancer Sci.* — 2006. — Vol. 97. — P. 72–79. — doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00139.x.
97. Rubenstein, J. L. [et al.] Rituximab therapy for CNS lymphomas: targeting the leptomeningeal compartment // *Blood.* — 2003. — Vol. 101. — P. 466–468. — doi: 10.1182/blood-2002-06-1636.
98. Deng, L. [et al.] Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma displays distinct clinical and biological features for treatment failure in rituximab era // *Leukemia.* — 2016. — Vol. 30. — P. 361–372. — doi: 10.1038/leu.2015.237.
99. Siddiqi, T. [et al.] CD19-directed CAR T-cell therapy for treatment of primary CNS lymphoma // *Blood Adv.* — 2021. — Vol. 5. — P. 4059–4063. — doi: 10.1182/bloodadvances.2020004106.
100. Epperla, N. [et al.] Outcomes of patients with secondary central nervous system lymphoma following CAR T-cell therapy: a multicenter cohort study // *J. Hematol. Oncol.* — 2023. — Vol. 16. — Art. 111. — doi: 10.1186/s13045-023-01508-3.
101. Chen, X. [et al.] Treatment of Testicular Relapse of B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia With CD19-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* — 2020. — Vol. 20. — P. 366–370. — doi: 10.1016/j.clml.2019.10.016.
102. Tomita, A. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance // *J. Clin. Exp. Hematop.* — 2016. — Vol. 56. — P. 89–99. — doi: 10.3960/jslrt.56.89.
103. Scialdone, A. [et al.] The HDAC inhibitor valproate induces a bivalent status of the CD20 promoter in CLL patients suggesting distinct epigenetic regulation of CD20 expression in CLL in vivo // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8. — P. 37409–37422. — doi: 10.18632/oncotarget.16964.
104. Damm, J. K. [et al.] Pharmacologically relevant doses of valproate upregulate CD20 expression in three diffuse large B-cell lymphoma patients in vivo // *Exp. Hematol. Oncol.* — 2015. — Vol. 4. — Art. 4. — doi: 10.1186/2162-3619-4-4.
105. Tsutsumi, Y. [et al.] 5-Azacytidine partially restores CD20 expression in follicular lymphoma that lost CD20 expression after rituximab treatment: a case report // *J. Med. Case Reports.* — 2016. — Vol. 10. — Art. 27. — doi: 10.1186/s13256-016-0809-7.
106. Merz, M. [et al.] Bispecific antibodies targeting BCMA or GPRC5D are highly effective in relapsed myeloma after CAR T-cell therapy // *Blood Cancer J.* — 2024. — Vol. 14. — Art. 214. — doi: 10.1038/s41408-024-01197-2.
107. Kim, J. CAR T cells vs bispecific antibody as third- or later-line large B-cell lymphoma therapy: a meta-analysis / J. Kim, J. Cho, M. H. Lee [et al.] // *Blood.* — 2024. — Vol. 144. — P. 629–638. — doi: 10.1182/blood.2023023419.

- 108.Trabolsi, A. Bispecific antibodies and CAR-T cells: dueling immunotherapies for large B-cell lymphomas / A. Trabolsi, A. Arumov, J. H. Schatz // *Blood Cancer J.* — 2024. — Vol. 14. — Art. 27. — doi: 10.1038/s41408-024-00997-w.
- 109.Mehta, M. [et al.] Meta-analysis of CAR-T and bispecific antibodies in follicular lymphoma: A comparative efficacy assessment // *JCO.* — 2025. — Vol. 43. — doi: 10.1200/JCO.2025.43.16_suppl.e19070.
- 110.Klein, C. [et al.] The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2024. — Vol. 23. — P. 301–319. — doi: 10.1038/s41573-024-00896-6.
- 111.Reff, M. E. [et al.] Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20 // *Blood.* — 1994. — Vol. 83. — P. 435–445. — doi: 10.1182/blood.V83.2.435.bloodjournal832435.
- 112.Oettgen, H. C. [et al.] Further biochemical studies of the human B-cell differentiation antigens B1 and B2 // *Hybridoma.* — 1983. — Vol. 2. — P. 17–28. — doi: 10.1089/hyb.1983.2.17.
- 113.Stashenko, P. [et al.] Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen // *J. Immunol.* — 1980. — Vol. 125. — P. 1678–1685.
- 114.Li, H. [et al.] The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 19893–19901. — doi: 10.1074/jbc.M400525200.
- 115.Rougé, L. [et al.] Structure of CD20 in complex with the therapeutic monoclonal antibody rituximab // *Science.* — 2020. — Vol. 367. — P. 1224–1230. — doi: 10.1126/science.aaz9356.
- 116.Shadman, M. [et al.] P1097: cd20 car-t therapy with mb-106 for btk inhibitor-refractory waldenström macroglobulinemia (wm)/ lymphoplasmacytic lymphoma (lpl) – single institution study // *HemaSphere.* — 2023. — Vol. 7. — Art. e68877ca. — doi: 10.1097/01.HS9.0000971284.68877.ca.
- 117.Wang, L. [et al.] Bispecific CAR-T cells targeting CD19/20 in patients with relapsed or refractory B cell non-Hodgkin lymphoma: a phase I/II trial // *Blood Cancer J.* — 2024. — Vol. 14. — Art. 130. — doi: 10.1038/s41408-024-01105-8.
- 118.Larson, S. [et al.] Rondecabtagene autoleucel, an autologous, dual-targeting CD19/CD20 CAR T-cell candidate manufactured from CD62L+ enriched T cells // *Blood.* — 2025. — Vol. 146. — Art. 668. — doi: 10.1182/blood-2025-668.
- 119.Vasu, S. [et al.] Initial Results of a First-in-Human, Phase I Study Point-of-Care Manufacturing of Trispecific CAR-T Cells Targeting CD19/20/22 in B-Cell Malignancies // *Blood.* — 2024. — Vol. 144. — Art. 2078. — doi: 10.1182/blood-2024-207532.
- 120.Schneider, D. [et al.] Trispecific CD19-CD20-CD22-targeting duoCAR-T cells eliminate antigen-heterogeneous B cell tumors in preclinical models // *Sci. Transl. Med.* — 2021. — Vol. 13. — Art. eabc6401. — doi: 10.1126/scitranslmed.abc6401.
- 121.Shah, N. N. [et al.] Phase 1 Study of Trispecific Anti-CD20, Anti-CD19, Anti-CD22 (CAR20.19.22) T Cells for Relapsed, Refractory B-Cell Malignancies // *Blood.* — 2024. — Vol. 144. — P. 3448–3448. — doi: 10.1182/blood-2024-200899.

122. Yan, Z. [et al.] A combination of humanised anti-CD19 and anti-BCMA CAR T cells in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a single-arm, phase 2 trial // *Lancet Haematol.* — 2019. — Vol. 6. — P. e521–e529. — doi: 10.1016/S2352-3026(19)30115-2.
123. Till, B. G. [et al.] Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells // *Blood.* — 2008. — Vol. 112. — P. 2261–2271. — doi: 10.1182/blood-2007-12-128843.
124. Wang, Y. [et al.] Effective response and delayed toxicities of refractory advanced diffuse large B-cell lymphoma treated by CD20-directed chimeric antigen receptor-modified T cells // *Clin. Immunol.* — 2014. — Vol. 155. — P. 160–175. — doi: 10.1016/j.clim.2014.10.002.
125. Zhang, W.-Y. [et al.] Treatment of CD20-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T cells in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an early phase IIa trial report // *Signal Transduct. Target. Ther.* — 2016. — Vol. 1. — Art. 16002. — doi: 10.1038/sigtrans.2016.2.
126. Cheng, Q. [et al.] CD20-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells as salvage therapy in rituximab-refractory/relapsed B-cell non-Hodgkin lymphoma // *Cytotherapy.* — 2022. — Vol. 24. — P. 1026–1034. — doi: 10.1016/j.jcyt.2022.05.001.
127. Chen, X. [et al.] Rational Tuning of CAR Tonic Signaling Yields Superior T-Cell Therapy for Cancer // *BioRxiv.* — 2020. — doi: 10.1101/2020.10.01.322990.
128. Rufener, G. A. [et al.] Preserved Activity of CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells in the Presence of Rituximab // *Cancer Immunol. Res.* — 2016. — Vol. 4. — P. 509–519. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0276.
129. Khan, A. N. [et al.] Immunogenicity of CAR-T Cell Therapeutics: Evidence, Mechanism and Mitigation // *Front. Immunol.* — 2022. — Vol. 13. — Art. 886546. — doi: 10.3389/fimmu.2022.886546.
130. Bartoló-Ibars, A. [et al.] T-cell responses against CD19-targeted CAR T cells varnimcabtagene autoleucel (ARI-0001): implications for immune response and therapy outcomes // *J. Immunother. Cancer.* — 2025. — Vol. 13. — doi: 10.1136/jitc-2024-010792.
131. Cang, S. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy / S. Cang, N. Mukhi, K. Wang, D. Liu // *J. Hematol. Oncol.* — 2012. — Vol. 5. — Art. 64. — doi: 10.1186/1756-8722-5-64.
132. Barth, M. J. [et al.] Ofatumumab demonstrates activity against rituximab-sensitive and -resistant cell lines, lymphoma xenografts and primary tumour cells from patients with B-cell lymphoma // *Br. J. Haematol.* — 2012. — Vol. 156. — P. 490–498. — doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08966.x.
133. Cheson, B. D. Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies // *J. Clin. Oncol.* — 2010. — Vol. 28. — P. 3525–3530. — doi: 10.1200/JCO.2010.27.9836.
134. Kulemzin, S. V. [et al.] Engineering chimeric antigen receptors // *Acta Naturae.* — 2017. — Vol. 9. — P. 6–14. — doi: 10.32607/20758251-2017-9-1-6-14.

135. Kershaw, M. H. [et al.] A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12. — P. 6106–6115. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
136. Wagner, D. L. [et al.] Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2021. — Vol. 18. — P. 379–393. — doi: 10.1038/s41571-021-00476-2.
137. Alfar, H. R. [et al.] Clinical evidence of immunogenicity of CAR-T cell therapies and its implication in the clinical development of CAR-T drug products // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16. — Art. 1512494. — doi: 10.3389/fimmu.2025.1512494.
138. Maus, M. V. [et al.] T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans // *Cancer Immunol. Res.* — 2013. — Vol. 1. — P. 26–31. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0006.
139. Lamers, C. H. J. [et al.] Treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with CAIX CAR-engineered T-cells—a completed study overview // *Biochem. Soc. Trans.* — 2016. — Vol. 44. — P. 951–959. — doi: 10.1042/BST20160037.
140. Wörn, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments / A. Wörn, A. Plückthun // *J. Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 305. — P. 989–1010. — doi: 10.1006/jmbi.2000.4265.
141. Long, A. H. [et al.] 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors // *Nat. Med.* — 2015. — Vol. 21. — P. 581–590. — doi: 10.1038/nm.3838.
142. Landoni, E. [et al.] Modifications to the framework regions eliminate chimeric antigen receptor tonic signaling // *Cancer Immunol. Res.* — 2021. — Vol. 9. — P. 441–453. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0451.
143. Chen, J. [et al.] Tuning charge density of chimeric antigen receptor optimizes tonic signaling and CAR-T cell fitness // *Cell Res.* — 2023. — Vol. 33. — P. 341–354. — doi: 10.1038/s41422-023-00789-0.
144. Qiu, S. [et al.] CAR-Toner: an AI-driven approach for CAR tonic signaling prediction and optimization // *Cell Res.* — 2024. — Vol. 34. — P. 386–388. — doi: 10.1038/s41422-024-00936-1.
145. Singh, N. [et al.] Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-costimulated CD22 CAR T cells // *Nat. Med.* — 2021. — Vol. 27. — P. 842–850. — doi: 10.1038/s41591-021-01326-5.
146. Jayaraman, J. [et al.] CAR-T design: Elements and their synergistic function // *EBioMedicine.* — 2020. — Vol. 58. — Art. 102931. — doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102931.
147. Vander Mause, E. R. [et al.] Roadmap to affinity-tuned antibodies for enhanced chimeric antigen receptor T cell function and selectivity // *Trends Biotechnol.* — 2022. — Vol. 40. — P. 875–890. — doi: 10.1016/j.tibtech.2021.12.009.
148. Ghorashian, S. [et al.] Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR // *Nat. Med.* — 2019. — Vol. 25. — P. 1408–1414. — doi: 10.1038/s41591-019-0549-5.

149. Hamers-Casterman, C. [et al.] Naturally occurring antibodies devoid of light chains // *Nature*. — 1993. — Vol. 363. — P. 446–448. — doi: 10.1038/363446a0.
150. De Munter, S. [et al.] Nanobody based dual specific cars // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018. — Vol. 19. — Art. 0403. — doi: 10.3390/ijms19020403.
151. Sidana, S. [et al.] Safety and efficacy of standard-of-care ciltacabtagene autoleucel for relapsed/refractory multiple myeloma // *Blood*. — 2025. — Vol. 145. — P. 85–97. — doi: 10.1182/blood.2024025945.
152. Safarzadeh Kozani, P. [et al.] Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy // *Biomark. Res.* — 2022. — Vol. 10. — Art. 24. — doi: 10.1186/s40364-022-00371-7.
153. Bao, C. [et al.] The Application of Nanobody in CAR-T Therapy // *Biomolecules*. — 2021. — Vol. 11. — Art. 0238. — doi: 10.3390/biom11020238.
154. Amoozgar, B. [et al.] Comparative Efficacy and Safety of Ciltacabtagene Autoleucel and Idecabtagene Vicleucel in Real-World Relapsed/Refractory Multiple Myeloma // *Blood*. — 2024. — Vol. 144. — P. 2408–2408. — doi: 10.1182/blood-2024-211671.
155. Rouet, R. Fully human VH single domains that rival the stability and cleft recognition of camelid antibodies / R. Rouet, K. Dudgeon, M. Christie, D. Langley, D. Christ // *J. Biol. Chem.* — 2015. — Vol. 290. — P. 11905–11917. — doi: 10.1074/jbc.M114.614842.
156. Wang, G. [et al.] Fully human antibody VH domains to generate mono and bispecific CAR to target solid tumors // *J. Immunother. Cancer*. — 2021. — Vol. 9. — Art. 002173. — doi: 10.1136/jitc-2020-002173.
157. Carstens, E. J. [et al.] Modeling and addressing on-target/off-tumor toxicity of claudin 18.2 targeted immunotherapies // *Nat. Commun.* — 2025. — Vol. 16. — Art. 9651. — doi: 10.1038/s41467-025-65148-6.
158. Brea, E. J. [et al.] Systematic Engineering of TROP2-Targeted CAR T-Cell Therapy Overcomes Resistance Pathways in Solid Tumors // *Cancer Immunol. Res.* — 2025. — Vol. 13. — P. 1749–1763. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-25-0527.
159. Lam, N. [et al.] Anti-BCMA chimeric antigen receptors with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains // *Nat. Commun.* — 2020. — Vol. 11. — Art. 283. — doi: 10.1038/s41467-019-14119-9.
160. Frigault, M. J. [et al.] Phase 1 study of CART-ddBCMA for the treatment of subjects with relapsed and refractory multiple myeloma // *Blood Adv.* — 2023. — Vol. 7. — P. 768–777. — doi: 10.1182/bloodadvances.2022007210.
161. Witter, A. R. [et al.] D-Domain Binder In Anitocabtagene Autoleucel Shows Absence of Tonic Signaling and Cross-Reactivity Profile // *Transplant. Cell. Ther.* — 2026. — Vol. 32. — P. S1–S2. — doi: 10.1016/j.jtct.2026.02.014.
162. Sauer, T. [et al.] CD70-specific CAR T cells have potent activity against acute myeloid leukemia without HSC toxicity // *Blood*. — 2021. — Vol. 138. — P. 318–330. — doi: 10.1182/blood.2020008221.

163. Perriello, V. M. [et al.] IL-3-zetakine combined with a CD33 costimulatory receptor as a dual CAR approach for safer and selective targeting of AML // *Blood Adv.* — 2023. — Vol. 7. — P. 2855–2871. — doi: 10.1182/bloodadvances.2022008762.
164. Brown, C. E. [et al.] Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL13R α 2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13-zetakine-redirected T Cells // *Clin. Cancer Res.* — 2012. — Vol. 18. — P. 2199–2209. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1669.
165. Baumeister, S. H. [et al.] Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma // *Cancer Immunol. Res.* — 2019. — Vol. 7. — P. 100–112. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0307.
166. Sallman, D. A. [et al.] CYAD-01, an autologous NKG2D-based CAR T-cell therapy, in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes or multiple myeloma (THINK) // *Lancet Haematol.* — 2023. — Vol. 10. — P. e191–e202. — doi: 10.1016/S2352-3026(22)00378-7.
167. Givi, S. [et al.] CRISPR/Cas9 TCR-Edited NKp30 CAR T Cells Exhibit Superior Anti-Tumor Immunity to B7H6-Expressing Leukemia and Melanoma // *Int. J. Mol. Sci.* — 2025. — Vol. 26. — Art. 8235. — doi: 10.3390/ijms26178235.
168. Hanssens, H. The antigen-binding moiety in the driver's seat of CARs / H. Hanssens, F. Meeus, K. De Veirman, K. Breckpot, N. Devoogdt // *Med. Res. Rev.* — 2022. — Vol. 42. — P. 306–342. — doi: 10.1002/med.21818.
169. Lee, L. [et al.] An APRIL-based chimeric antigen receptor for dual targeting of BCMA and TACI in multiple myeloma // *Blood.* — 2018. — Vol. 131. — P. 746–758. — doi: 10.1182/blood-2017-05-781351.
170. Lee, L. [et al.] Limited efficacy of APRIL CAR in patients with multiple myeloma indicate challenges in the use of natural ligands for CAR T-cell therapy // *J. Immunother. Cancer.* — 2023. — Vol. 11. — doi: 10.1136/jitc-2023-006699.
171. Schmidts, A. [et al.] Rational design of a trimeric APRIL-based CAR-binding domain enables efficient targeting of multiple myeloma // *Blood Adv.* — 2019. — Vol. 3. — P. 3248–3260. — doi: 10.1182/bloodadvances.2019000703.
172. Graham, C. [et al.] First-in-human phase 1 trial of trimeric APRIL (TriPRIL) CAR T cells in relapsed or refractory multiple myeloma // *Blood.* — 2025. — Vol. 146. — P. 270–270. — doi: 10.1182/blood-2025-270.
173. Plückthun, A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2015. — Vol. 55. — P. 489–511. — doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
174. Hammill, J. A. [et al.] Designed ankyrin repeat proteins are effective targeting elements for chimeric antigen receptors // *J. Immunother. Cancer.* — 2015. — Vol. 3. — Art. 55. — doi: 10.1186/s40425-015-0099-4.
175. Siegler, E. Designed Ankyrin Repeat Proteins as Her2 Targeting Domains in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells / E. Siegler, S. Li, Y. J. Kim, P. Wang // *Hum. Gene Ther.* — 2017. — Vol. 28. — P. 726–736. — doi: 10.1089/hum.2017.021.

176. Balakrishnan, A. [et al.] Multispecific Targeting with Synthetic Ankyrin Repeat Motif Chimeric Antigen Receptors // *Clin. Cancer Res.* — 2019. — Vol. 25. — P. 7506–7516. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1479.
177. Li, D. [et al.] A novel PD-L1-targeted shark VNAR single-domain-based CAR-T cell strategy for treating breast cancer and liver cancer // *Mol. Ther. Oncolytics.* — 2022. — Vol. 24. — P. 849–863. — doi: 10.1016/j.omto.2022.02.015.
178. Han, X. Adnectin-Based Design of Chimeric Antigen Receptor for T Cell Engineering / X. Han, G. E. Cinay, Y. Zhao [et al.] // *Mol. Ther.* — 2017. — Vol. 25. — P. 2466–2476. — doi: 10.1016/j.ymthe.2017.07.009.
179. Kulemzin, S. V. [et al.] VEGFR2-specific FnCAR effectively redirects the cytotoxic activity of T cells and YT NK cells // *Oncotarget.* — 2018. — Vol. 9. — P. 9021–9029. — doi: 10.18632/oncotarget.24078.
180. Lyons, S. A. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin / S. A. Lyons, J. O’Neal, H. Sontheimer // *Glia.* — 2002. — Vol. 39. — P. 162–173. — doi: 10.1002/glia.10082.
181. Barish, M. E. [et al.] Chlorotoxin-directed CAR T cell therapy for recurrent glioblastoma: Interim clinical experience demonstrating feasibility and safety // *Cell Rep. Med.* — 2025. — Vol. 6. — Art. 102302. — doi: 10.1016/j.xcrm.2025.102302.
182. Stepanov, A. V. [et al.] Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma // *Sci. Adv.* — 2018. — Vol. 4. — Art. eaau4580. — doi: 10.1126/sciadv.aau4580.
183. Cho, J. H. Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T cell responses / J. H. Cho, J. J. Collins, W. W. Wong // *Cell.* — 2018. — Vol. 173. — P. 1426–1438.e11. — doi: 10.1016/j.cell.2018.03.038.
184. Moritz, D. A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity / D. Moritz, B. Groner // *Gene Ther.* — 1995. — Vol. 2. — P. 539–546.
185. Patel, S. D. [et al.] Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function // *Gene Ther.* — 1999. — Vol. 6. — P. 412–419. — doi: 10.1038/sj.gt.3300831.
186. Xiao, Q. [et al.] Size-dependent activation of CAR-T cells // *Sci. Immunol.* — 2022. — Vol. 7. — Art. eabl3995. — doi: 10.1126/sciimmunol.abl3995.
187. Wilkie, S. [et al.] Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor // *J. Immunol.* — 2008. — Vol. 180. — P. 4901–4909. — doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4901.
188. Hudecek, M. [et al.] The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity // *Cancer Immunol. Res.* — 2015. — Vol. 3. — P. 125–135. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0127.
189. Guest, R. D. [et al.] The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors // *J. Immunother.* — 2005. — Vol. 28. — P. 203–211. — doi: 10.1097/01.cji.0000161397.96582.59.

190. Smith, R. Bringing cell therapy to tumors: considerations for optimal CAR binder design // *Antib. Ther.* — 2023. — Vol. 6. — P. 225–239. — doi: 10.1093/abt/tbad019.
191. Mirazee, J. M. [et al.] Hinging on Success: Leveraging the Power of CAR T-Cell Therapy through In-Silico Modeling of Hinge Length and Epitope Location // *J. Immunol.* — 2023. — Vol. 210. — P. 68.06. — doi: 10.4049/jimmunol.210.Supp.68.06.
192. Xiong, Y. The physical landscape of CAR-T synapse / Y. Xiong, K. A. Libby, X. Su // *Biophys. J.* — 2024. — Vol. 123. — P. 2199–2210. — doi: 10.1016/j.bpj.2023.09.004.
193. Choudhuri, K. [et al.] T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand // *Nature.* — 2005. — Vol. 436. — P. 578–582. — doi: 10.1038/nature03843.
194. Mirazee, J. [et al.] 401 Hinge length: A novel method of predicting cytotoxicity of CAR constructs against antigen-low leukemia // *Regular and Young Investigator Award Abstracts.* — BMJ Publishing Group Ltd, 2022. — P. A423–A423.
195. Burton, J. [et al.] Optimising CAR-T cell sensitivity by engineering matched extracellular sizes between CAR/antigen and CD2/CD58 adhesion complexes // *BioRxiv.* — 2025. — doi: 10.1101/2025.01.06.631424.
196. Sadelain, M. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors / M. Sadelain, R. Brentjens, I. Rivière // *Curr. Opin. Immunol.* — 2009. — Vol. 21. — P. 215–223. — doi: 10.1016/j.coi.2009.02.009.
197. Almåsbak, H. [et al.] Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model // *Gene Ther.* — 2015. — Vol. 22. — P. 391–403. — doi: 10.1038/gt.2015.4.
198. Watanabe, N. [et al.] Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency // *Oncoimmunology.* — 2016. — Vol. 5. — Art. e1253656. — doi: 10.1080/2162402X.2016.1253656.
199. Riddell, S. R. Carving the CAR / S. R. Riddell, U. Protzer // *Gene Ther.* — 2010. — Vol. 17. — P. 1191–1192. — doi: 10.1038/gt.2010.96.
200. Fujiwara, K. [et al.] Hinge and transmembrane domains of chimeric antigen receptor regulate receptor expression and signaling threshold // *Cells.* — 2020. — Vol. 9. — Art. 1182. — doi: 10.3390/cells9051182.
201. Sun, Y. [et al.] Antigen-induced chimeric antigen receptor multimerization amplifies on-tumor cytotoxicity // *Signal Transduct. Target. Ther.* — 2023. — Vol. 8. — Art. 445. — doi: 10.1038/s41392-023-01686-z.
202. Bister, A. [et al.] Optimized NGFR-derived hinges for rapid and efficient enrichment and detection of CAR T cells in vitro and in vivo // *Mol. Ther. Oncolytics.* — 2022. — Vol. 26. — P. 120–134. — doi: 10.1016/j.omto.2022.05.012.
203. Imai, C. [et al.] Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia.* — 2004. — Vol. 18. — P. 676–684. — doi: 10.1038/sj.leu.2403302.

204. Pulè, M. A. [et al.] A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells // *Mol. Ther.* — 2005. — Vol. 12. — P. 933–941. — doi: 10.1016/j.ymthe.2005.04.016.
205. Bridgeman, J. S. [et al.] CD3 ζ -based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms // *Clin. Exp. Immunol.* — 2014. — Vol. 175. — P. 258–267. — doi: 10.1111/cei.12216.
206. Bridgeman, J. S. [et al.] The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 184. — P. 6938–6949. — doi: 10.4049/jimmunol.0901766.
207. Hombach, A. [et al.] An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells // *Int. J. Cancer.* — 2000. — Vol. 88. — P. 115–120. — PMID: 10962448
208. Jackson, Z. [et al.] Automated Manufacture of Autologous CD19 CAR-T Cells for Treatment of Non-hodgkin Lymphoma // *Front. Immunol.* — 2020. — Vol. 11. — Art. 1941. — doi: 10.3389/fimmu.2020.1941.
209. Roberts, M. R. [et al.] Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors // *Blood.* — 1994. — Vol. 84. — P. 2878–2889. — doi: 10.1182/blood.V84.9.2878.2878.
210. Guedan, S. [et al.] Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation // *JCI Insight.* — 2018. — Vol. 3. — doi: 10.1172/jci.insight.96976.
211. Geiger, T. L. [et al.] Integrated src kinase and costimulatory activity enhances signal transduction through single-chain chimeric receptors in T lymphocytes // *Blood.* — 2001. — Vol. 98. — P. 2364–2371. — doi: 10.1182/blood.v98.8.2364.
212. Zhang, T. [et al.] Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy // *Blood.* — 2005. — Vol. 106. — P. 1544–1551. — doi: 10.1182/blood-2004-11-4365.
213. Barber, A. [et al.] Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 5003–5008. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4047.
214. A Chimeric Antigen Receptor (CARs) Based Upon a Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Triggers Robust Cytotoxic Activity in Solid Tumors // *Mol. Ther.* — 2014. — Vol. 22. — P. S57. — doi: 10.1016/S1525-0016(16)35165-6.
215. Sun, M. [et al.] Construction and evaluation of a novel humanized HER2-specific chimeric receptor // *Breast Cancer Res.* — 2014. — Vol. 16. — Art. R61. — doi: 10.1186/bcr3674.
216. Muller, Y. D. [et al.] The CD28-Transmembrane Domain Mediates Chimeric Antigen Receptor Heterodimerization With CD28 // *Front. Immunol.* — 2021. — Vol. 12. — Art. 639818. — doi: 10.3389/fimmu.2021.639818.
217. Li, N. [et al.] The IgG4 hinge with CD28 transmembrane domain improves VHH-based CAR T cells targeting a membrane-distal epitope of GPC1 in pancreatic cancer // *Nat. Commun.* — 2023. — Vol. 14. — Art. 1986. — doi: 10.1038/s41467-023-37616-4.

218. Elazar, A. [et al.] De novo-designed transmembrane domains tune engineered receptor functions // *eLife*. — 2022. — Vol. 11. — doi: 10.7554/eLife.75660.
219. Kuwana, Y. [et al.] Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1987. — Vol. 149. — P. 960–968. — doi: 10.1016/0006-291x(87)90502-x.
220. Eshhar, Z. [et al.] Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1993. — Vol. 90. — P. 720–724. — doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
221. Bretscher, P. A theory of self-nonsel discrimination / P. Bretscher, M. Cohn // *Science*. — 1970. — Vol. 169. — P. 1042–1049. — doi: 10.1126/science.169.3950.1042.
222. Hege, K. M. [et al.] Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer // *J. Immunother. Cancer*. — 2017. — Vol. 5. — Art. 22. — doi: 10.1186/s40425-017-0222-9.
223. Sterner, R. C. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies / R. C. Sterner, R. M. Sterner // *Blood Cancer J*. — 2021. — Vol. 11. — Art. 69. — doi: 10.1038/s41408-021-00459-7.
224. Finney, H. M. [et al.] Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161. — P. 2791–2797. — doi: 10.4049/jimmunol.161.6.2791.
225. Maher, J. [et al.] Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 20. — P. 70–75. — doi: 10.1038/nbt0102-70.
226. Wang, J. [et al.] Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains // *Hum. Gene Ther.* — 2007. — Vol. 18. — P. 712–725. — doi: 10.1089/hum.2007.028.
227. Song, D.-G. [et al.] CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo // *Blood*. — 2012. — Vol. 119. — P. 696–706. — doi: 10.1182/blood-2011-03-344275.
228. Collinson-Pautz, M. R. [et al.] Constitutively active MyD88/CD40 costimulation enhances expansion and efficacy of chimeric antigen receptor T cells targeting hematological malignancies // *Leukemia*. — 2019. — Vol. 33. — P. 2195–2207. — doi: 10.1038/s41375-019-0417-9.
229. Milone, M. C. [et al.] Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo // *Mol. Ther.* — 2009. — Vol. 17. — P. 1453–1464. — doi: 10.1038/mt.2009.83.
230. Guedan, S. [et al.] ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells // *Blood*. — 2014. — Vol. 124. — P. 1070–1080. — doi: 10.1182/blood-2013-10-535245.
231. Kawalekar, O. U. [et al.] Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells // *Immunity*. — 2016. — Vol. 44. — P. 380–390. — doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.021.

232. Karlsson, H. [et al.] Evaluation of intracellular signaling downstream chimeric antigen receptors // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10. — Art. e0144787. — doi: 10.1371/journal.pone.0144787.
233. Carpenito, C. [et al.] Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — Vol. 106. — P. 3360–3365. — doi: 10.1073/pnas.0813101106.
234. Derigs, P. [et al.] Third-generation anti-CD19 CAR T cells for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a phase 1/2 study // *Leukemia*. — 2024. — Vol. 38. — P. 2419–2428. — doi: 10.1038/s41375-024-02392-7.
235. Weinkove, R. [et al.] A Phase 1 Dose Escalation Trial of Third-Generation CD19-Directed CAR T-Cells Incorporating CD28 and Toll-like Receptor 2 (TLR2) Intracellular Domains // *Blood*. — 2023. — Vol. 142. — Art. 890. — doi: 10.1182/blood-2023-178872.
236. Davila, M. L. Chimeric antigen receptor therapy for chronic lymphocytic leukemia: what are the challenges? / M. L. Davila, R. Brentjens // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* — 2013. — Vol. 27. — P. 341–353. — doi: 10.1016/j.hoc.2012.12.004.
237. Grupp, S. A. [et al.] Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2013. — Vol. 368. — P. 1509–1518. — doi: 10.1056/NEJMoa1215134.
238. Gaud, G. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling / G. Gaud, R. Lesourne, P. E. Love // *Nat. Rev. Immunol.* — 2018. — Vol. 18. — P. 485–497. — doi: 10.1038/s41577-018-0020-8.
239. Ip, J. Y. [et al.] Global analysis of alternative splicing during T-cell activation // *RNA*. — 2007. — Vol. 13. — P. 563–572. — doi: 10.1261/rna.457207.
240. Grigoryev, Y. A. [et al.] Genome-wide analysis of immune activation in human T and B cells reveals distinct classes of alternatively spliced genes // *PLoS ONE*. — 2009. — Vol. 4. — Art. e7906. — doi: 10.1371/journal.pone.0007906.
241. Raghavan, A. [et al.] Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Vol. 30. — P. 5529–5538. — doi: 10.1093/nar/gkf682.
242. Rabani, M. [et al.] Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells // *Nat. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 29. — P. 436–442. — doi: 10.1038/nbt.1861.
243. Istomine, R. Posttranscriptional and translational control of gene regulation in CD4+ T cell subsets / R. Istomine, N. Pavay, C. A. Piccirillo // *J. Immunol.* — 2016. — Vol. 196. — P. 533–540. — doi: 10.4049/jimmunol.1501337.
244. Vivier, E. Natural killer cell signaling pathways / E. Vivier, J. A. Nunès, F. Vély // *Science*. — 2004. — Vol. 306. — P. 1517–1519. — doi: 10.1126/science.1103478.
245. Paul, S. A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor- κ B / S. Paul, B. C. Schaefer // *Trends Immunol.* — 2013. — Vol. 34. — P. 269–281. — doi: 10.1016/j.it.2013.02.002.
246. Dal Porto, J. M. [et al.] B cell antigen receptor signaling 101 // *Mol. Immunol.* — 2004. — Vol. 41. — P. 599–613. — doi: 10.1016/j.molimm.2004.04.008.

247. Paul, S. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy / S. Paul, G. Lal // *Front. Immunol.* — 2017. — Vol. 8. — Art. 1124. — doi: 10.3389/fimmu.2017.01124.
248. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells // *Blood.* — 2008. — Vol. 112. — P. 461–469. — doi: 10.1182/blood-2007-09-077438.
249. Harris, D. T. Adoptive T cell therapies: A comparison of T cell receptors and chimeric antigen receptors / D. T. Harris, D. M. Kranz // *Trends Pharmacol. Sci.* — 2016. — Vol. 37. — P. 220–230. — doi: 10.1016/j.tips.2015.11.004.
250. Han, J. [et al.] CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells // *Sci. Rep.* — 2015. — Vol. 5. — Art. 11483. — doi: 10.1038/srep11483.
251. Romanski, A. [et al.] CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies // *J. Cell. Mol. Med.* — 2016. — Vol. 20. — P. 1287–1294. — doi: 10.1111/jcmm.12810.
252. Lei, W. [et al.] Safety and feasibility of 4-1BB co-stimulated CD19-specific CAR-NK cell therapy in refractory/relapsed large B cell lymphoma: a phase 1 trial // *Nat. Cancer.* — 2025. — Vol. 6. — P. 786–800. — doi: 10.1038/s43018-025-00940-3.
253. Liu, E. [et al.] Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 382. — P. 545–553. — doi: 10.1056/NEJMoa1910607.
254. Acharya, S. [et al.] CD28 costimulation augments CAR signaling in NK cells via the lck/cd3 ζ /zap70 signaling axis // *Cancer Discov.* — 2024. — Vol. 14. — P. 1879–1900. — doi: 10.1158/2159-8290.CD-24-0096.
255. Chen, K. H. [et al.] Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor // *Leukemia.* — 2017. — Vol. 31. — P. 2151–2160. — doi: 10.1038/leu.2017.8.
256. Kok, N. [et al.] CD28 signaling domain boosts persistence and in vivo anti-tumor activity of stem cell-derived CD19-CAR-NK cells // *iScience.* — 2025. — Vol. 28. — Art. 112548. — doi: 10.1016/j.isci.2025.112548.
257. Yi, E. [et al.] A chimeric antigen receptor tailored to integrate complementary activation signals potentiates the antitumor activity of NK cells // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* — 2025. — Vol. 44. — Art. 86. — doi: 10.1186/s13046-025-03351-5.
258. Li, Y. [et al.] Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity // *Cell Stem Cell.* — 2018. — Vol. 23. — P. 181–192. — doi: 10.1016/j.stem.2018.06.002.
259. Williams, M. D. [et al.] TRAFFic signals: High-throughput CAR discovery in NK cells reveals novel TRAF-binding endodomains that drive enhanced persistence and cytotoxicity // *BioRxiv.* — 2023. — doi: 10.1101/2023.08.02.551530.
260. Swanson, L. [et al.] Development of Next-Generation NK Cell Optimized Chimeric Antigen Receptors (CARs) for iPSC-Derived NK Cell Therapies // *Blood.* — 2022. — Vol. 140. — P. 4540–4541. — doi: 10.1182/blood-2022-163884.

261. Wang, Z. [et al.] Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors // *Cell. Mol. Immunol.* — 2021. — Vol. 18. — P. 2188–2198. — doi: 10.1038/s41423-021-00749-x.
262. Kumar, J. [et al.] Deletion of Cbl-b inhibits CD8⁺ T-cell exhaustion and promotes CAR T-cell function // *J. Immunother. Cancer.* — 2021. — Vol. 9. — doi: 10.1136/jitc-2020-001688.
263. Jung, I.-Y. [et al.] CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells // *Cancer Res.* — 2018. — Vol. 78. — P. 4692–4703. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0030.
264. Sutra Del Galy, A. [et al.] In vivo genome-wide CRISPR screens identify SOCS1 as intrinsic checkpoint of CD4⁺ TH1 cell response // *Sci. Immunol.* — 2021. — Vol. 6. — Art. eabe8219. — doi: 10.1126/sciimmunol.abe8219.
265. Du, X. [et al.] Targeting PTPN2 enhances human CAR T cell efficacy and the development of long-term memory in mouse xenograft models // *Sci. Transl. Med.* — 2025. — Vol. 17. — Art. eadk0627. — doi: 10.1126/scitranslmed.adk0627.
266. Zhou, J.-E. [et al.] ShRNA-mediated silencing of PD-1 augments the efficacy of chimeric antigen receptor T cells on subcutaneous prostate and leukemia xenograft // *Biomed. Pharmacother.* — 2021. — Vol. 137. — Art. 111339. — doi: 10.1016/j.biopha.2021.111339.
267. Zhang, H. [et al.] shRNA-mediated gene silencing of HDAC11 empowers CAR-T cells against prostate cancer // *Front. Immunol.* — 2024. — Vol. 15. — Art. 1369406. — doi: 10.3389/fimmu.2024.1369406.
268. Lontos, K. [et al.] Metabolic reprogramming via an engineered PGC-1 α improves human chimeric antigen receptor T-cell therapy against solid tumors // *J. Immunother. Cancer.* — 2023. — Vol. 11. — doi: 10.1136/jitc-2022-006522.
269. Wu, M.-H. [et al.] Deleting the mitochondrial respiration negative regulator MCJ enhances the efficacy of CD8⁺ T cell adoptive therapies in pre-clinical studies // *Nat. Commun.* — 2024. — Vol. 15. — Art. 4444. — doi: 10.1038/s41467-024-48653-y.
270. Nakagawara, K. [et al.] NR4A ablation improves mitochondrial fitness for long persistence in human CAR-T cells against solid tumors // *J. Immunother. Cancer.* — 2024. — Vol. 12. — doi: 10.1136/jitc-2023-008665.
271. Yao, H. [et al.] Reshaping CAR-T cells through overexpression of T cell factor 1 // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16. — Art. 1623869. — doi: 10.3389/fimmu.2025.1623869.
272. Tang, J. [et al.] Runx3-overexpression cooperates with ex vivo AKT inhibition to generate receptor-engineered T cells with better persistence, tumor-residency, and antitumor ability // *J. Immunother. Cancer.* — 2023. — Vol. 11. — doi: 10.1136/jitc-2022-006119.
273. Zhao, Y. [et al.] IL-10-expressing CAR T cells resist dysfunction and mediate durable clearance of solid tumors and metastases // *Nat. Biotechnol.* — 2024. — Vol. 42. — P. 1693–1704. — doi: 10.1038/s41587-023-02060-8.
274. Doan, A. E. [et al.] FOXO1 is a master regulator of memory programming in CAR T cells // *Nature.* — 2024. — Vol. 629. — P. 211–218. — doi: 10.1038/s41586-024-07300-8.

275. Bell, M. Engineered cytokine signaling to improve CAR T cell effector function / M. Bell, S. Gottschalk // *Front. Immunol.* — 2021. — Vol. 12. — Art. 684642. — doi: 10.3389/fimmu.2021.684642.
276. Pegram, H. J. [et al.] Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning // *Blood.* — 2012. — Vol. 119. — P. 4133–4141. — doi: 10.1182/blood-2011-12-400044.
277. Sánchez-Moreno, I. [et al.] Tethered IL15-IL15R α augments antitumor activity of CD19 CAR-T cells but displays long-term toxicity in an immunocompetent lymphoma mouse model // *J. Immunother. Cancer.* — 2024. — Vol. 12. — doi: 10.1136/jitc-2023-008572.
278. Hu, B. [et al.] Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18 // *Cell Rep.* — 2017. — Vol. 20. — P. 3025–3033. — doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.002.
279. Svoboda, J. [et al.] Enhanced CAR T-Cell Therapy for Lymphoma after Previous Failure // *N. Engl. J. Med.* — 2025. — Vol. 392. — P. 1824–1835. — doi: 10.1056/NEJMoa2408771.
280. Nguyen, R. [et al.] Cooperative Armoring of CAR and TCR T Cells by T Cell-Restricted IL15 and IL21 Universally Enhances Solid Tumor Efficacy // *Clin. Cancer Res.* — 2024. — Vol. 30. — P. 1555–1566. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-1872.
281. Castelli, S. [et al.] IL-9 signaling redirects CAR T cell fate toward CD8⁺ memory and CD4⁺ cycling states, enhancing antitumor efficacy // *Immunity.* — 2026. — Vol. 59. — P. 195–212. — doi: 10.1016/j.immuni.2025.10.021.
282. Wang, Y. [et al.] An IL-4/21 Inverted Cytokine Receptor Improving CAR-T Cell Potency in Immunosuppressive Solid-Tumor Microenvironment // *Front. Immunol.* — 2019. — Vol. 10. — Art. 1691. — doi: 10.3389/fimmu.2019.1691.
283. Mohammed, S. [et al.] Improving Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cell Function by Reversing the Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer // *Mol. Ther.* — 2017. — Vol. 25. — P. 249–258. — doi: 10.1016/j.ymthe.2016.10.016.
284. Rane, R. [et al.] Chimeric switch and inverted cytokine receptors in T cell therapy // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16. — Art. 1662238. — doi: 10.3389/fimmu.2025.1662238.
285. Eisenberg, V. [et al.] Targeting Tumor-Associated Sialic Acids Using Chimeric Switch Receptors Based on Siglec-9 // *Cancer Immunol. Res.* — 2024. — Vol. 12. — P. 1380–1391. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-23-0823.
286. Stephan, M. T. [et al.] T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection // *Nat. Med.* — 2007. — Vol. 13. — P. 1440–1449. — doi: 10.1038/nm1676.
287. Drent, E. [et al.] Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells // *Clin. Cancer Res.* — 2019. — Vol. 25. — P. 4014–4025. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2559.
288. Park, J. H. [et al.] A Phase I First-in-Human Clinical Trial of CD19-Targeted 19-28z/4-1BBL “Armored” CAR T Cells in Patients with Relapsed or Refractory NHL and CLL // *Blood.* — 2018. — Vol. 132. — P. 224–224. — doi: 10.1182/blood-2018-99-117737.

289. Zhao, Z. [et al.] Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells // *Cancer Cell*. — 2015. — Vol. 28. — P. 415–428. — doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.004.
290. Zhang, H. [et al.] A chimeric antigen receptor with antigen-independent OX40 signaling mediates potent antitumor activity // *Sci. Transl. Med.* — 2021. — Vol. 13. — doi: 10.1126/scitranslmed.aba7308.
291. Hu, B. [et al.] CAR T Cells Secreting IL18 Augment Antitumor Immunity and Increase T Cell Proliferation and Costimulation // *bioRxiv*. — 2017. — doi: 10.1101/2017.09.002.
292. Terakura, S. [et al.] Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells // *Blood*. — 2012. — Vol. 119. — P. 72–82. — doi: 10.1182/blood-2011-07-366419.
293. Klebanoff, C. A. [et al.] Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy // *J. Clin. Invest.* — 2016. — Vol. 126. — P. 318–334. — doi: 10.1172/JCI81217.
294. Sallusto, F. [et al.] Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions // *Nature*. — 1999. — Vol. 401. — P. 708–712. — doi: 10.1038/44385.
295. Gattinoni, L. [et al.] A human memory T cell subset with stem cell-like properties // *Nat. Med.* — 2011. — Vol. 17. — P. 1290–1297. — doi: 10.1038/nm.2446.
296. Schmueck-Henneresse, M. [et al.] Comprehensive Approach for Identifying the T Cell Subset Origin of CD3 and CD28 Antibody-Activated Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells // *J. Immunol.* — 2017. — Vol. 199. — P. 348–362. — doi: 10.4049/jimmunol.1601494.
297. Berger, C. [et al.] Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates // *J. Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 118. — P. 294–305. — doi: 10.1172/JCI32103.
298. Schmueck, M. [et al.] Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central memory T cells by partial targeting of the IL-2 receptor signaling pathway // *J. Immunol.* — 2012. — Vol. 188. — P. 5189–5198. — doi: 10.4049/jimmunol.1103763.
299. Carrasco, J. [et al.] CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation // *Blood*. — 2006. — Vol. 108. — P. 2897–2905. — doi: 10.1182/blood-2005-11-007237.
300. Wang, X. [et al.] Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice // *Blood*. — 2011. — Vol. 117. — P. 1888–1898. — doi: 10.1182/blood-2010-10-31059.
301. Savoldo, B. [et al.] Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) // *Blood*. — 2006. — Vol. 108. — P. 2942–2949. — doi: 10.1182/blood-2006-05-021782.
302. Bollard, C. M. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease / C. M. Bollard, C. M. Rooney, H. E. Heslop // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2012. — Vol. 9. — P. 510–519. — doi: 10.1038/nrclinonc.2012.111.

303. Brestrich, G. [et al.] Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy // *Am. J. Transplant.* — 2009. — Vol. 9. — P. 1679–1684. — doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02672.x.
304. Wang, X. [et al.] Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8+ central memory T cells manufactured at clinical scale // *J. Immunother.* — 2012. — Vol. 35. — P. 689–701. — doi: 10.1097/CJI.0b013e318270dec7.
305. Sommermeyer, D. [et al.] Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo // *Leukemia.* — 2016. — Vol. 30. — P. 492–500. — doi: 10.1038/leu.2015.247.
306. Turtle, C. J. [et al.] CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients // *J. Clin. Invest.* — 2016. — Vol. 126. — P. 2123–2138. — doi: 10.1172/JCI85309.
307. Lee, S. Y. [et al.] CD8+ chimeric antigen receptor T cells manufactured in absence of CD4+ cells exhibit hypofunctional phenotype // *J. Immunother. Cancer.* — 2023. — Vol. 11. — doi: 10.1136/jitc-2023-007803.
308. Cappell, K. M. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far / K. M. Cappell, J. N. Kochenderfer // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2023. — Vol. 20. — P. 359–371. — doi: 10.1038/s41571-023-00754-1.
309. Müller, F. [et al.] CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease - A Case Series with Follow-up // *N. Engl. J. Med.* — 2024. — Vol. 390. — P. 687–700. — doi: 10.1056/NEJMoa2308917.
310. Escobar, G. CAR-T cells in solid tumors: Challenges and breakthroughs / G. Escobar, T. R. Berger, M. V. Maus // *Cell Rep. Med.* — 2025. — Vol. 6. — Art. 102353. — doi: 10.1016/j.xcrm.2025.102353.
311. Thommen, D. S. T cell dysfunction in cancer / D. S. Thommen, T. N. Schumacher // *Cancer Cell.* — 2018. — Vol. 33. — P. 547–562. — doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.012.
312. Abdo, L. Cost-effective strategies for CAR-T cell therapy manufacturing / L. Abdo, L. R. Batista-Silva, M. H. Bonamino // *Mol. Ther. Oncol.* — 2025. — Vol. 33. — Art. 200980. — doi: 10.1016/j.omton.2025.200980.
313. Dagher, O. K. Forks in the road for CAR T and CAR NK cell cancer therapies / O. K. Dagher, A. D. Posey // *Nat. Immunol.* — 2023. — Vol. 24. — P. 1994–2007. — doi: 10.1038/s41590-023-01659-y.
314. Sivori, S. [et al.] Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications // *Cell. Mol. Immunol.* — 2019. — Vol. 16. — P. 430–441. — doi: 10.1038/s41423-019-0206-4.
315. Sun, H. The rise of NK cell checkpoints as promising therapeutic targets in cancer immunotherapy / H. Sun, C. Sun // *Front. Immunol.* — 2019. — Vol. 10. — Art. 2354. — doi: 10.3389/fimmu.2019.2354.
316. Long, E. O. [et al.] Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition // *Annu. Rev. Immunol.* — 2013. — Vol. 31. — P. 227–258. — doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005.

317. Freud, A. G. [et al.] The broad spectrum of human natural killer cell diversity // *Immunity*. — 2017. — Vol. 47. — P. 820–833. — doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.
318. Orange, J. S. [et al.] The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 14151–14156. — doi: 10.1073/pnas.1835830100.
319. Carlsten, M. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: techniques and clinical implications / M. Carlsten, R. W. Childs // *Front. Immunol.* — 2015. — Vol. 6. — Art. 266. — doi: 10.3389/fimmu.2015.00266.
320. Uherek, C. [et al.] Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction // *Blood*. — 2002. — Vol. 100. — P. 1265–1273. — doi: 10.1182/blood.V100.4.1265.h81602001265.
321. Klingemann, H. Are natural killer cells superior CAR drivers? // *Oncoimmunology*. — 2014. — Vol. 3. — Art. e28147. — doi: 10.4161/onci.28147.
322. Klingemann, H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells // *Cytotherapy*. — 2015. — Vol. 17. — P. 245–249. — doi: 10.1016/j.jcyt.2014.09.007.
323. Boissel, L. [et al.] Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells // *Leuk. Res.* — 2009. — Vol. 33. — P. 1255–1259. — doi: 10.1016/j.leukres.2008.11.024.
324. Bachanova, V. [et al.] Safety and Efficacy of FT522, a First-in-Class, Multi-Antigen Targeted, Off-the-Shelf, iPSC-Derived CD19 CAR NK Cell Therapy // *Blood*. — 2024. — Vol. 144. — Art. 6543. — doi: 10.1182/blood-2024-198684.
325. Ghobadi, A. [et al.] Induced pluripotent stem-cell-derived CD19-directed chimeric antigen receptor natural killer cells in B-cell lymphoma: a phase 1 trial // *Lancet*. — 2025. — Vol. 405. — P. 127–136. — doi: 10.1016/S0140-6736(24)02462-0.
326. Ramachandran, I. [et al.] Multiple Doses of Cnty-101, an iPSC-Derived Allogeneic CD19 Targeting CAR-NK product, Are Safe and Result in Tumor Microenvironment Changes // *Blood*. — 2023. — Vol. 142. — Art. 1654. — doi: 10.1182/blood-2023-182313.
327. Patel, K. [et al.] Interim results from the ELiPSE-1 study: A phase 1 study of CNTY-101 in subjects with relapsed or refractory CD19-positive B-cell malignancies // *JCO*. — 2024. — Vol. 42. — Art. 7023. — doi: 10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.7023.
328. Marin, D. [et al.] Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19+ B cell tumors: a phase 1/2 trial // *Nat. Med.* — 2024. — Vol. 30. — P. 772–784. — doi: 10.1038/s41591-023-02785-8.
329. Huang, R. [et al.] Safety and efficacy of CD33-targeted CAR-NK cell therapy for relapsed/refractory AML: preclinical evaluation and phase I trial // *Exp. Hematol. Oncol.* — 2025. — Vol. 14. — Art. 1. — doi: 10.1186/s40164-024-00592-6.
330. Thomson, J. [et al.] Single agent off-the-shelf CAR-NK (CD-19 t-haNK) cell therapy in combination with rituxumab Results in complete response in participants with waldenstrom's macroglobulinemia // *Blood*. — 2025. — Vol. 146. — Art. 5950. — doi: 10.1182/blood-2025-5950.

331. Burger, M. C. [et al.] Intracranial injection of natural killer cells engineered with a HER2-targeted chimeric antigen receptor in patients with recurrent glioblastoma // *Neuro Oncol.* — 2023. — Vol. 25. — P. 2058–2071. — doi: 10.1093/neuonc/noad087.
332. Lin, J. [et al.] A phase I trial of combination CAR-NK92MI immunotherapy by dual targeting MUC-1 and PD-L1 for patients with relapsed or refractory solid tumors // *BMC Pulm. Med.* — 2025. — Vol. 25. — Art. 482. — doi: 10.1186/s12890-025-03944-y.
333. Tang, X. [et al.] First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia // *Am. J. Cancer Res.* — 2018. — Vol. 8. — P. 1083–1089.
334. Hernandez, I. Accounting for All Costs in the Total Cost of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy-Reply / I. Hernandez, V. Prasad, W. F. Gellad // *JAMA Oncol.* — 2018. — Vol. 4. — P. 1785–1786. — doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4657.
335. Xu, J. [et al.] In-vivo B-cell maturation antigen CAR T-cell therapy for relapsed or refractory multiple myeloma // *Lancet.* — 2025. — Vol. 406. — P. 228–231. — doi: 10.1016/S0140-6736(25)01030-X.
336. Harrison, S. [et al.] Minimal residual disease (MRD)-negative outcomes following a novel, in vivo gene therapy generating anti-BCMA CAR-T cells in RRMM // *Blood.* — 2025. — Vol. 146. — Art. LBA-1. — doi: 10.1182/blood-2025-LBA-1.
337. Wang, Q. [et al.] In Vivo CD19 CAR T-Cell Therapy for Refractory Systemic Lupus Erythematosus // *N. Engl. J. Med.* — 2025. — Vol. 393. — P. 1542–1544. — doi: 10.1056/NEJMc2509522.
338. Torikai, H. [et al.] A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific CAR and eliminate expression of endogenous TCR // *Blood.* — 2012. — Vol. 119. — P. 5697–5705. — doi: 10.1182/blood-2012-01-405365.
339. Themeli, M. New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy / M. Themeli, I. Rivière, M. Sadelain // *Cell Stem Cell.* — 2015. — Vol. 16. — P. 357–366. — doi: 10.1016/j.stem.2015.03.011.
340. Valton, J. [et al.] A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy // *Mol. Ther.* — 2015. — Vol. 23. — P. 1507–1518. — doi: 10.1038/mt.2015.104.
341. Ren, J. [et al.] A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8. — P. 17002–17011. — doi: 10.18632/oncotarget.15218.
342. Poirot, L. [et al.] Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies // *Cancer Res.* — 2015. — Vol. 75. — P. 3853–3864. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3321.
343. Perica, K. [et al.] HIV immune evasin Nef enhances allogeneic CAR T cell potency // *Nature.* — 2025. — Vol. 640. — P. 793–801. — doi: 10.1038/s41586-025-08657-0.
344. Grauwet, K. [et al.] Stealth transgenes enable CAR-T cells to evade host immune responses // *J. Immunother. Cancer.* — 2024. — Vol. 12. — doi: 10.1136/jitc-2023-008417.

345. Wang, X. [et al.] S264: preliminary analyses of a non-gene-editing allogeneic car-t in cd19+ relapsed or refractory non-hodgin's lymphoma // *HemaSphere*. — 2022. — Vol. 6. — P. 165–166. — doi: 10.1097/01.HS9.0000843948.58401.85.
346. Liu, K. [et al.] Upgrading the non-gene-editing, allogeneic ThisCART platform for extending persistence in vivo // *JCO*. — 2023. — Vol. 41. — Art. e14569. — doi: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.e14569.
347. Karpanasamy, T. [et al.] A Novel Protein-Based Approach to Generate Allogeneic CAR-T Cells with Simultaneous TCR and MHC Class 1 Downregulation // *Blood*. — 2022. — Vol. 140. — P. 636–637. — doi: 10.1182/blood-2022-167980.
348. Rami, F. Induced pluripotent stem cell as a new source for cancer immunotherapy / F. Rami, H. Mollainezhad, M. Salehi // *Genet. Res. Int.* — 2016. — Vol. 2016. — Art. 3451807. — doi: 10.1155/2016/3451807.
349. Senju, S. [et al.] Immunotherapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells // *Semin. Immunopathol.* — 2011. — Vol. 33. — P. 603–612. — doi: 10.1007/00281-011-0263-y.
350. Mehta, A. [et al.] Interim Phase I Clinical Data of FT819-101, a Study of the First-Ever, Off-the-Shelf, iPSC-Derived TCR-Less CD19 CAR T-Cell Therapy // *Blood*. — 2022. — Vol. 140. — P. 4577–4578. — doi: 10.1182/blood-2022-167194.
351. Themeli, M. [et al.] Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy // *Nat. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 31. — P. 928–933. — doi: 10.1038/nbt.2678.
352. Fang, Y. Engineering the next generation of allogeneic CAR cells: iPSCs as a scalable and editable platform / Y. Fang, Y. Chen, Y.-R. Li // *Stem Cell Reports*. — 2025. — Vol. 20. — Art. 102515. — doi: 10.1016/j.stemcr.2025.102515.
353. Iyer, S. P. [et al.] Safety and activity of CTX130, a CD70-targeted allogeneic CRISPR-Cas9-engineered CAR T-cell therapy, in RR T-cell malignancies (COBALT-LYM) // *Lancet Oncol.* — 2025. — Vol. 26. — P. 110–122. — doi: 10.1016/S1470-2045(24)00508-4.
354. Dholaria, Dr. B. [et al.] A Phase 1 Study of P-BCMA-ALLO1, a Non-Viral, Allogeneic BCMA Directed CAR-T in RRMM // *Transplant. Cell. Ther.* — 2025. — Vol. 31. — P. S38. — doi: 10.1016/j.jtct.2025.01.051.
355. Su, J. [et al.] Genome-edited allogeneic CAR-T cells: the next generation of cancer immunotherapies // *J. Hematol. Oncol.* — 2025. — Vol. 18. — Art. 90. — doi: 10.1186/s13045-025-01745-8.
356. Wang, X. [et al.] Allogeneic CD19-targeted CAR-T therapy in patients with severe myositis and systemic sclerosis // *Cell*. — 2024. — Vol. 187. — P. 4890–4904. — doi: 10.1016/j.cell.2024.06.027.
357. Qasim, W. [et al.] Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells // *Sci. Transl. Med.* — 2017. — Vol. 9. — doi: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.
358. Diorio, C. [et al.] Cytosine base editing enables quadruple-edited allogeneic CART cells for T-ALL // *Blood*. — 2022. — Vol. 140. — P. 619–629. — doi: 10.1182/blood.2022015825.

359. Depil, S. “Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges / S. Depil, P. Duchateau, S. A. Grupp [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2020. — Vol. 19. — P. 185–199. — doi: 10.1038/s41573-019-0051-2.
360. Chiesa, R. [et al.] Base-Edited CAR7 T Cells for Relapsed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2023. — Vol. 389. — P. 899–910. — doi: 10.1056/NEJMoa2300707.
361. Diorio, C. [et al.] BEAM-201 for the Treatment of R/R T-ALL or T-LL: Initial Data from the Phase 1/2 Study of Multiplex Base-Edited Allogeneic Anti-CD7 CAR-T-Cells // *Blood.* — 2024. — Vol. 144. — Art. 4838. — doi: 10.1182/blood-203546.
362. Schett, G. [et al.] Advancements and challenges in CAR T cell therapy in autoimmune diseases // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2024. — Vol. 20. — P. 531–544. — doi: 10.1038/s41584-024-01139-z.
363. Li, J. [et al.] Optimizing CAR T cell therapy for solid tumours: a clinical perspective // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2025. — Vol. 22. — P. 953–968. — doi: 10.1038/s41571-025-01075-1.
364. Klichinsky, M. [et al.] Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy // *Nat. Biotechnol.* — 2020. — Vol. 38. — P. 947–953. — doi: 10.1038/s41587-020-0462-y.
365. Xia, X. [et al.] Reshaping the tumor immune microenvironment to improve CAR-T cell-based cancer immunotherapy // *Mol. Cancer.* — 2024. — Vol. 23. — Art. 175. — doi: 10.1186/s12943-024-02079-8.
366. Adachi, K. CAR-T cells co-expressing IL-7 and CCL19 promote epitope spreading to enhance antitumor immunity / K. Adachi, Y. Sakoda, T. Kaisho, K. Tamada // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2026. — Vol. 75. — Art. 68. — doi: 10.1007/s00262-026-04316-z.
367. Tang, L. [et al.] Arming CAR-T cells with cytokines and more: Innovations in the fourth-generation CAR-T development // *Mol. Ther.* — 2023. — Vol. 31. — P. 3146–3162. — doi: 10.1016/j.ymthe.2023.09.021.
368. Steffin, D. [et al.] Interleukin-15-armed GPC3-CAR T cells for patients with solid cancers // *Res. Sq.* — 2024. — doi: 10.21203/rs.3.rs-4103623/v1.
369. Szlasa, W. [et al.] Efficient combination of radiotherapy and CAR-T - A systematic review // *Biomed. Pharmacother.* — 2024. — Vol. 174. — Art. 116532. — doi: 10.1016/j.biopha.2024.116532.
370. Song, D.-G. [et al.] Chimeric NKG2D CAR-expressing T cell-mediated attack of human ovarian cancer is enhanced by histone deacetylase inhibition // *Hum. Gene Ther.* — 2013. — Vol. 24. — P. 295–305. — doi: 10.1089/hum.2012.143.
371. Al-Haideri, M. [et al.] CAR-T cell combination therapy: the next revolution in cancer treatment // *Cancer Cell Int.* — 2022. — Vol. 22. — Art. 365. — doi: 10.1186/s12935-022-02778-6.
372. Caruana, I. [et al.] K562-Derived Whole-Cell Vaccine Enhances Antitumor Responses of CAR-Redirected Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes In Vivo // *Clin. Cancer Res.* — 2015. — Vol. 21. — P. 2952–2962. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2998.

373. Nishio, N. [et al.] Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors // *Cancer Res.* — 2014. — Vol. 74. — P. 5195–5205. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0697.
374. Li, Y.-R. Boosting CAR-T cell therapy through vaccine synergy / Y.-R. Li, Z. Lyu, X. Shen [et al.] // *Trends Pharmacol. Sci.* — 2025. — Vol. 46. — P. 180–199. — doi: 10.1016/j.tips.2024.12.004.
375. John, L. B. [et al.] Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells // *Clin. Cancer Res.* — 2013. — Vol. 19. — P. 5636–5646. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
376. Kobold, S. [et al.] Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2015. — Vol. 107. — Art. 364. — doi: 10.1093/jnci/dju364.
377. Grosser, R. [et al.] Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors // *Cancer Cell.* — 2019. — Vol. 36. — P. 471–482. — doi: 10.1016/j.ccell.2019.09.006.
378. Uslu, U. CAR T cell combination therapies to treat cancer / U. Uslu, S. Castelli, C. H. June // *Cancer Cell.* — 2024. — Vol. 42. — P. 1319–1325. — doi: 10.1016/j.ccell.2024.07.002.
379. Karlsson, H. [et al.] Combining CAR T cells and the Bcl-2 family apoptosis inhibitor ABT-737 for treating B-cell malignancy // *Cancer Gene Ther.* — 2013. — Vol. 20. — P. 386–393. — doi: 10.1038/cgt.2013.35.
380. Huye, L. E. [et al.] Combining mTor inhibitors with rapamycin-resistant T cells: a two-pronged approach to tumor elimination // *Mol. Ther.* — 2011. — Vol. 19. — P. 2239–2248. — doi: 10.1038/mt.2011.179.
381. Gargett, T. [et al.] BRAF and MEK inhibition variably affect GD2-specific chimeric antigen receptor (CAR) T-cell function in vitro // *J. Immunother.* — 2015. — Vol. 38. — P. 12–23. — doi: 10.1097/CJI.0000000000000061.
382. Yang, B. [et al.] Advances in the combination of CAR-T therapy with small-molecule reagents for hematologic malignancies // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16. — Art. 1663522. — doi: 10.3389/fimmu.2025.1663522.
383. Agliardi, G. [et al.] Accelerating and optimising CAR T-cell manufacture to deliver better patient products // *Lancet Haematol.* — 2025. — Vol. 12. — P. e57–e67. — doi: 10.1016/S2352-3026(24)00273-4.
384. Geurts, M. Locoregional delivery of chimeric antigen receptor-T cells: Breaking the spell in glioblastoma? / M. Geurts, M. Preusser // *Neuro Oncol.* — 2024. — Vol. 26. — P. 1177–1180. — doi: 10.1093/neuonc/noae063.
385. Goodman, D. B. [et al.] Pooled screening of CAR T cells identifies diverse immune signaling domains for next-generation immunotherapies // *Sci. Transl. Med.* — 2022. — Vol. 14. — Art. eabm1463. — doi: 10.1126/scitranslmed.abm1463.

386. Alonso-Camino, V. [et al.] Lymphocyte display: a novel antibody selection platform based on T cell activation // *PLoS ONE*. — 2009. — Vol. 4. — Art. e7174. — doi: 10.1371/journal.pone.0007174.
387. Maynard, L. H. [et al.] Pooled CAR-T screening in nonhuman primates identifies designs with enhanced proliferation, trafficking, and persistence // *BioRxiv*. — 2025. — doi: 10.1101/2025.03.05.640197.
388. Gordon, K. S. [et al.] Pooled screening for CAR function identifies novel IL-13R α 2-targeted CARs for treatment of glioblastoma // *J. Immunother. Cancer*. — 2025. — Vol. 13. — doi: 10.1136/jitc-2024-009574.
389. Castellanos-Rueda, R. [et al.] Dissecting the role of CAR signaling architectures on T cell activation and persistence using pooled screens and single-cell sequencing // *Sci. Adv.* — 2025. — Vol. 11. — Art. eadp4008. — doi: 10.1126/sciadv.adp4008.
390. Roex, G. [et al.] Expanding the CAR toolbox with high throughput screening strategies for CAR domain exploration: a comprehensive review // *J. Immunother. Cancer*. — 2025. — Vol. 13. — doi: 10.1136/jitc-2024-010658.
391. Soemardy, C. [et al.] Screening of a pooled library of chimeric antigen receptor T cells based on secretory function // *BioRxiv*. — 2025. — doi: 10.1101/2025.07.02.662376.
392. Daniels, K. G. [et al.] Decoding CAR T cell phenotype using combinatorial signaling motif libraries and machine learning // *Science*. — 2022. — Vol. 378. — P. 1194–1200. — doi: 10.1126/science.abq0225.
393. Duong, C. P. M. [et al.] Engineering T cell function using chimeric antigen receptors identified using a DNA library approach // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8. — Art. e63037. — doi: 10.1371/journal.pone.0063037.
394. Zoine, J. T. [et al.] Peptide-scFv antigen recognition domains effectively confer CAR T cell multiantigen specificity // *Cell Rep. Med.* — 2024. — Vol. 5. — Art. 101422. — doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101422.
395. Hyrenius-Wittsten, A. [et al.] SynNotch CAR circuits enhance solid tumor recognition and promote persistent antitumor activity in mouse models // *Sci. Transl. Med.* — 2021. — Vol. 13. — doi: 10.1126/scitranslmed.abd8836.
396. Moghimi, B. [et al.] Preclinical assessment of the efficacy and specificity of GD2-B7H3 SynNotch CAR-T in metastatic neuroblastoma // *Nat. Commun.* — 2021. — Vol. 12. — Art. 511. — doi: 10.1038/s41467-020-20785-x.
397. Roybal, K. T. [et al.] Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits // *Cell*. — 2016. — Vol. 164. — P. 770–779. — doi: 10.1016/j.cell.2016.01.011.
398. Mansilla-Soto, J. [et al.] HLA-independent T cell receptors for targeting tumors with low antigen density // *Nat. Med.* — 2022. — Vol. 28. — P. 345–352. — doi: 10.1038/s41591-021-01621-1.
399. Huang, D. [et al.] TCR-mimicking STAR conveys superior sensitivity over CAR in targeting tumors with low-density neoantigens // *Cell Rep.* — 2024. — Vol. 43. — Art. 114949. — doi: 10.1016/j.celrep.2024.114949.

400. Wang, J. [et al.] A novel adoptive synthetic TCR and antigen receptor (STAR) T-Cell therapy for B-Cell acute lymphoblastic leukemia // *Am. J. Hematol.* — 2022. — Vol. 97. — P. 992–1004. — doi: 10.1002/ajh.2658.
401. Baeuerle, P. A. [et al.] Synthetic TRuC receptors engaging the complete T cell receptor for potent anti-tumor response // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10. — Art. 2087. — doi: 10.1038/s41467-019-10097-0.
402. Simon, S. [et al.] Design of sensitive monospecific and bispecific synthetic chimeric T cell receptors for cancer therapy // *Nat. Cancer.* — 2025. — Vol. 6. — P. 647–665. — doi: 10.1038/s43018-025-00927-0.
403. Helsen, C. W. [et al.] The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity // *Nat. Commun.* — 2018. — Vol. 9. — Art. 3049. — doi: 10.1038/s41467-018-05395-y.
404. Wu, C.-Y. [et al.] Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor // *Science.* — 2015. — Vol. 350. — Art. aab4077. — doi: 10.1126/science.aab4077.
405. Liu, X. [et al.] Split chimeric antigen receptor-modified T cells targeting glypican-3 suppress hepatocellular carcinoma growth // *Ther. Adv. Med. Oncol.* — 2020. — Vol. 12. — Art. 1758835920910347. — doi: 10.1177/1758835920910347.
406. Wang, E. [et al.] Generation of Potent T-cell Immunotherapy for Cancer Using DAP12-Based, Multichain, Chimeric Immunoreceptors // *Cancer Immunol. Res.* — 2015. — Vol. 3. — P. 815–826. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0054.
407. Han, X. [et al.] Masked Chimeric Antigen Receptor for Tumor-Specific Activation // *Mol. Ther.* — 2017. — Vol. 25. — P. 274–284. — doi: 10.1016/j.ymthe.2016.10.011.
408. Hamieh, M. Programming CAR T cell tumor recognition: tuned antigen sensing and logic gating / M. Hamieh, J. Mansilla-Soto, I. Rivière, M. Sadelain // *Cancer Discov.* — 2023. — Vol. 13. — P. 829–843. — doi: 10.1158/2159-8290.CD-23-0101.
409. Si, X. Preclinical evaluation of CAR T cell function: in vitro and in vivo models / X. Si, L. Xiao, C. E. Brown, D. Wang // *Int. J. Mol. Sci.* — 2022. — Vol. 23. — doi: 10.3390/ijms23063154.
410. Kamat, R. H. [et al.] CAR-T Cells: Design Principles, Core Concepts, and Clinical Applications // *Cell-based Immunotherapies for Cancer* / eds. A. K. Mishra, S. K. Malonia. — Cham : Springer Nature Switzerland, 2025. — P. 99–126.
411. Liang, A. [et al.] Safety and efficacy of a novel anti-CD20 CAR-T cell therapy in r/r B-NHL patients after failing CD19 CAR-T therapy // *JCO.* — 2021. — Vol. 39. — Art. 2508. — doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.2508.
412. Cheng, Z. [et al.] In Vivo Expansion and Antitumor Activity of Coinfused CD28- and 4-1BB-Engineered CAR-T Cells in Patients with B Cell Leukemia // *Mol. Ther.* — 2018. — Vol. 26. — P. 976–985. — doi: 10.1016/j.ymthe.2018.01.022.
413. Zhao, X. [et al.] Efficacy and Safety of CD28- or 4-1BB-Based CD19 CAR-T Cells in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia // *Mol. Ther. Oncolytics.* — 2020. — Vol. 18. — P. 272–281. — doi: 10.1016/j.omto.2020.06.016.

414. Neelapu, S. S. Managing the toxicities of CAR T-cell therapy // *Hematol. Oncol.* — 2019. — Vol. 37, suppl. 1. — P. 48–52. — doi: 10.1002/hon.2595.
415. Brentjens, R. J. [et al.] Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with B-cell leukemias // *Blood.* — 2011. — Vol. 118. — P. 4817–4828. — doi: 10.1182/blood-2011-04-348540.
416. Morgan, R. A. Adoptive cell therapy: genetic modification to redirect effector cell specificity / R. A. Morgan, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg // *Cancer J.* — 2010. — Vol. 16. — P. 336–341. — doi: 10.1097/PPO.0b013e3181eb3879.
417. Kochenderfer, J. N. [et al.] Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor // *J. Immunother.* — 2009. — Vol. 32. — P. 689–702. — doi: 10.1097/CJI.0b013e3181ac6138.
418. Golubovskaya, V. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy / V. Golubovskaya, L. Wu // *Cancers (Basel).* — 2016. — Vol. 8. — doi: 10.3390/cancers8030036.
419. Moeller, M. [et al.] Adoptive transfer of gene-engineered CD4+ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection // *Blood.* — 2005. — Vol. 106. — P. 2995–3003. — doi: 10.1182/blood-2004-12-4906.
420. Moeller, M. [et al.] Sustained antigen-specific antitumor recall response mediated by gene-modified CD4+ T helper-1 and CD8+ T cells // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 11428–11437. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1141.
421. Hudecek, M. [et al.] Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells // *Clin. Cancer Res.* — 2013. — Vol. 19. — P. 3153–3164. — doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.
422. Cuffel, A. [et al.] Real-world characteristics of T-cell apheresis and clinical response to tisagenlecleucel in B-cell lymphoma // *Blood Adv.* — 2022. — Vol. 6. — P. 4657–4660. — doi: 10.1182/bloodadvances.2022007057.
423. Kamdar, M. K. [et al.] Optimizing post-chimeric antigen receptor (CAR) T cell monitoring: Evidence across lisocabtagene maraleucel (liso-cel) pivotal clinical trials and real-world experience // *JCO.* — 2025. — Vol. 43. — Art. 7026. — doi: 10.1200/JCO.2025.43.16_suppl.7026.
424. Rufer, N. [et al.] Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions // *Blood.* — 2003. — Vol. 102. — P. 1779–1787. — doi: 10.1182/blood-2003-02-0420.
425. Romero, P. [et al.] Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 178. — P. 4112–4119. — doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4112.
426. Funk, C. R. [et al.] Oligoclonal T Cells Transiently Expand and Express Tim-3 and PD-1 Following Anti-CD19 CAR T Cell Therapy: A Case Report // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018. — Vol. 19. — Art. 4118. — doi: 10.3390/ijms19124118.

427. Wherry, E. J. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion / E. J. Wherry, M. Kurachi // *Nat. Rev. Immunol.* — 2015. — Vol. 15. — P. 486–499. — doi: 10.1038/nri3862.
428. Amezquita, R. A. Immunology: The chronicles of T-cell exhaustion / R. A. Amezquita, S. M. Kaech // *Nature.* — 2017. — Vol. 543. — P. 190–191. — doi: 10.1038/nature21508.
429. Jiang, G. [et al.] Dual CAR-T cells to treat cancers co-expressing NKG2D and PD1 ligands in xenograft models of peritoneal metastasis // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2023. — Vol. 72. — P. 223–234. — doi: 10.1007/s00262-022-03247-9.
430. Liu, G. [et al.] PD-1 silencing improves anti-tumor activities of human mesothelin-targeted CAR T cells // *Hum. Immunol.* — 2021. — Vol. 82. — P. 130–138. — doi: 10.1016/j.humimm.2020.12.002.
431. Chen, N. CAR T-cell intrinsic PD-1 checkpoint blockade: A two-in-one approach for solid tumor immunotherapy / N. Chen, A. Morello, Z. Tano, P. S. Adusumilli // *Oncoimmunology.* — 2017. — Vol. 6. — Art. e1273302. — doi: 10.1080/2162402X.2016.1273302.
432. Caruso, H. G. [et al.] Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity // *Cancer Res.* — 2015. — Vol. 75. — P. 3505–3518. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0139.
433. Liu, X. [et al.] Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice // *Cancer Res.* — 2015. — Vol. 75. — P. 3596–3607. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0159.
434. Duan, Y. [et al.] Tuning the ignition of CAR: optimizing the affinity of scFv to improve CAR-T therapy // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2021. — Vol. 79. — Art. 14. — doi: 10.1007/s00018-021-04089-x.
435. Greenman, R. [et al.] Shaping functional avidity of CAR T cells: affinity, avidity, and antigen density that regulate response // *Mol. Cancer Ther.* — 2021. — Vol. 20. — P. 872–884. — doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1109.
436. Majzner, R. G. [et al.] Low CD19 antigen density diminishes efficacy of CD19 CAR T cells and can be overcome by rational redesign of CAR signaling domains // *Blood.* — 2018. — Vol. 132. — Art. 963. — doi: 10.1182/blood-2018-99-115558.
437. Mamonkin, M. [et al.] A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies // *Blood.* — 2015. — Vol. 126. — P. 983–992. — doi: 10.1182/blood-2015-02-629527.
438. Gattinoni, L. T memory stem cells in health and disease / L. Gattinoni, D. E. Speiser, M. Lichterfeld, C. Bonini // *Nat. Med.* — 2017. — Vol. 23. — P. 18–27. — doi: 10.1038/nm.4241.
439. Meyran, D. [et al.] Early-phenotype CAR-T cells for the treatment of pediatric cancers // *Ann. Oncol.* — 2021. — Vol. 32. — P. 1366–1380. — doi: 10.1016/j.annonc.2021.07.018.
440. Künkele, A. [et al.] Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8+ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD // *Cancer Immunol. Res.* — 2015. — Vol. 3. — P. 368–379. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0200.

441. Liu, Y. [et al.] IL-2 regulates tumor-reactive CD8⁺ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor // *Nat. Immunol.* — 2021. — Vol. 22. — P. 358–369. — doi: 10.1038/s41590-020-00850-9.
442. Bailey, S. R. [et al.] Blockade or Deletion of IFN γ Reduces Macrophage Activation without Compromising CAR T-cell function // *Blood Cancer Discov.* — 2022. — Vol. 3. — P. 136–153. — doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0181.
443. Taraseviciute, A. Creation of the First Non-Human Primate Model That Faithfully Recapitulates CAR T Cell-Mediated CRS and Neurologic Toxicity / A. Taraseviciute, L. Kean, M. C. Jensen // *Blood.* — 2016. — Vol. 128. — Art. 651. — doi: 10.1182/blood.V128.22.651.651.
444. Taraseviciute, A. [et al.] Chimeric Antigen Receptor T Cell-Mediated Neurotoxicity in Nonhuman Primates // *Cancer Discov.* — 2018. — Vol. 8. — P. 750–763. — doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1368.
445. Kenderian, S. S. [et al.] Ruxolitinib Prevents Cytokine Release Syndrome after Car T-Cell Therapy Without Impairing the Anti-Tumor Effect // *Biol. Blood Marrow Transplant.* — 2017. — Vol. 23. — P. S19–S20. — doi: 10.1016/j.bbmt.2016.12.003.
446. Sterner, R. M. [et al.] GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function // *Blood.* — 2019. — Vol. 133. — P. 697–709. — doi: 10.1182/blood-2018-10-881722.
447. Giavridis, T. [et al.] CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade // *Nat. Med.* — 2018. — Vol. 24. — P. 731–738. — doi: 10.1038/s41591-018-0041-7.
448. Pennell, C. A. [et al.] Human CD19-Targeted Mouse T Cells Induce B Cell Aplasia and Toxicity in Human CD19 Transgenic Mice // *Mol. Ther.* — 2018. — Vol. 26. — P. 1423–1434. — doi: 10.1016/j.ymthe.2018.04.006.
449. Wei, J. [et al.] The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma // *Signal Transduct. Target. Ther.* — 2020. — Vol. 5. — Art. 134. — doi: 10.1038/s41392-020-00256-x.
450. Karalewitz, A. [et al.] CAR T-cell generation for therapeutic testing in the disseminated NALM6 human B-cell acute lymphoblastic leukemia mouse model // *Cancer Res.* — 2022. — Vol. 82. — Art. 2835. — doi: 10.1158/1538-7445.AM2022-2835.
451. Hamann, D. [et al.] Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells // *J. Exp. Med.* — 1997. — Vol. 186. — P. 1407–1418. — doi: 10.1084/jem.186.9.1407.
452. Kymriah | European Medicines Agency (EMA) [Electronic resource]. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah> (дата обращения: 03.03.2026).
453. Gauthier, J. [et al.] Factors associated with outcomes after a second CD19-targeted CAR T-cell infusion for refractory B-cell malignancies // *Blood.* — 2021. — Vol. 137. — P. 323–335. — doi: 10.1182/blood.2020006770.
454. Turtle, C. J. [et al.] CD19 CAR–T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients // *J. Clin. Invest.* — 2016. — Vol. 126. — P. 2123–2138. — doi: 10.1172/JCI85309.

455. Gauthier, J. [et al.] Phase 1 study of CD19 CAR T-cell therapy harboring a fully human scFv in CAR-naïve adult patients with B-ALL // *Blood Adv.* — 2025. — Vol. 9. — P. 1861–1872. — doi: 10.1182/bloodadvances.2024015314.
456. Gaspar, N. [et al.] Evaluation of NanoLuc substrates for bioluminescence imaging of transferred cells in mice // *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* — 2021. — Vol. 216. — Art. 112128. — doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112128.
457. Shipunova, V. O. [et al.] A Highly Specific Substrate for NanoLUC Luciferase Furimazine Is Toxic in vitro and in vivo // *Russ. J. Bioorg. Chem.* — 2018. — Vol. 44. — P. 225–228. — doi: 10.1134/S1068162018020085.
458. Germain-Genevois, C. [et al.] Detection of brain tumors and systemic metastases using nanoluc and fluc for dual reporter imaging // *Mol. Imaging Biol.* — 2016. — Vol. 18. — P. 62–69. — doi: 10.1007/s11307-015-0864-2.
459. Shah, N. N. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy / N. N. Shah, T. J. Fry // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2019. — Vol. 16. — P. 372–385. — doi: 10.1038/s41571-019-0184-6.
460. Ruella, M. [et al.] Mechanisms of resistance to chimeric antigen receptor-T cells in haematological malignancies // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2023. — Vol. 22. — P. 976–995. — doi: 10.1038/s41573-023-00807-1.
461. Cronk, R. J. Bispecific chimeric antigen receptor T cell therapy for B cell malignancies and multiple myeloma / R. J. Cronk, J. Zurko, N. N. Shah // *Cancers (Basel)*. — 2020. — Vol. 12. — doi: 10.3390/cancers12092523.
462. Counsell, J. R. [et al.] Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy // *Sci. Rep.* — 2017. — Vol. 7. — Art. 44775. — doi: 10.1038/srep44775.
463. Gomes-Silva, D. [et al.] Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent // *Cell Rep.* — 2017. — Vol. 21. — P. 17–26. — doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.015.
464. Qin, H. [et al.] Preclinical development of bivalent chimeric antigen receptors targeting both CD19 and CD22 // *Mol. Ther. Oncolytics*. — 2018. — Vol. 11. — P. 127–137. — doi: 10.1016/j.omto.2018.10.006.
465. Yu, W. [et al.] A phase 1 trial of prinzoncabtagene autoleucel, a CD19/CD20 CAR T-cell therapy for relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma // *Blood*. — 2025. — Vol. 145. — P. 1526–1535. — doi: 10.1182/blood.2024026401.
466. Tong, C. [et al.] Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma // *Blood*. — 2020. — Vol. 136. — P. 1632–1644. — doi: 10.1182/blood.2020005278.
467. Zhang, Y. [et al.] Long-term activity of tandem CD19/CD20 CAR therapy in refractory/relapsed B-cell lymphoma: a single-arm, phase 1-2 trial // *Leukemia*. — 2022. — Vol. 36. — P. 189–196. — doi: 10.1038/s41375-021-01345-8.
468. Shah, N. N. [et al.] P1082: results from a phase 1/2 study of tandem, bispecific anti-cd20/anti-cd19 (lv20.19) car t-cells for mantle cell lymphoma // *HemaSphere*. — 2023. — Vol. 7. — Art. e207658e. — doi: 10.1097/01.HS9.0000971224.20765.8e.

469. Lou, J. [et al.] Lymphodepletion-free j1-lightning CAR-T targeting CD19/CD22/BCMA achieved 100% CR in 3 Relapsed/Refractory B-NHL patients // *Blood*. — 2025. — Vol. 146. — Art. 4168. — doi: 10.1182/blood-2025-4168.
470. Suck, G. [et al.] NK-92: an “off-the-shelf therapeutic” for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2016. — Vol. 65. — P. 485–492. — doi: 10.1007/s00262-015-1761-x.
471. Zuccolotto, G. [et al.] CT-227 Dual CAR-Engineered NK92 Cells: An Off-the-Shelf Cell Therapy for Cancer // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* — 2022. — Vol. 22, suppl. 2. — P. S440. — doi: 10.1016/S2152-2650(22)01658-5.
472. Mace, E. M. Human natural killer cells: Form, function, and development // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2023. — Vol. 151. — P. 371–385. — doi: 10.1016/j.jaci.2022.09.022.
473. Tong, L. [et al.] NK cells and solid tumors: therapeutic potential and persisting obstacles // *Mol. Cancer*. — 2022. — Vol. 21. — Art. 206. — doi: 10.1186/s12943-022-01672-z.
474. López-Soto, A. [et al.] Control of metastasis by NK cells // *Cancer Cell*. — 2017. — Vol. 32. — P. 135–154. — doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.009.
475. Miller, J. S. [et al.] Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer // *Blood*. — 2005. — Vol. 105. — P. 3051–3057. — doi: 10.1182/blood-2004-07-2974.
476. Ruggeri, L. [et al.] Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants // *Science*. — 2002. — Vol. 295. — P. 2097–2100. — doi: 10.1126/science.1068440.
477. Ma, S. Natural killer cell-based immunotherapy for cancer / S. Ma, J. Yu, M. A. Caligiuri // *J. Immunol.* — 2025. — Vol. 214. — P. 1444–1456. — doi: 10.1093/jimmun/vkaf036.
478. Herrera, L. [et al.] Adult peripheral blood and umbilical cord blood NK cells are good sources for effective CAR therapy against CD19 positive leukemic cells // *Sci. Rep.* — 2019. — Vol. 9. — Art. 18729. — doi: 10.1038/s41598-019-55239-y.
479. Tanaka, H. [et al.] Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood // *Eur. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 71. — P. 29–38. — doi: 10.1034/j.1600-0609.2003.00081.x.
480. Liu, E. [et al.] Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity // *Leukemia*. — 2018. — Vol. 32. — P. 520–531. — doi: 10.1038/leu.2017.226.
481. Suck, G. [et al.] KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity // *Exp. Hematol.* — 2005. — Vol. 33. — P. 1160–1171. — doi: 10.1016/j.exphem.2005.06.024.
482. Vahidian, F. [et al.] The tricks for fighting against cancer using CAR NK cells: A review // *Mol. Cell. Probes*. — 2022. — Vol. 63. — Art. 101817. — doi: 10.1016/j.mcp.2022.101817.
483. Jørgensen, L. V. [et al.] The clinical landscape of CAR NK cells // *Exp. Hematol. Oncol.* — 2025. — Vol. 14. — Art. 46. — doi: 10.1186/s40164-025-00633-8.

484. Huang, Y. [et al.] DNAM1 and 2B4 Costimulatory Domains Enhance the Cytotoxicity of Anti-GPC3 Chimeric Antigen Receptor-Modified Natural Killer Cells // *Cancer Manag. Res.* — 2020. — Vol. 12. — P. 3247–3255. — doi: 10.2147/CMAR.S253565.
485. Dos Santos, M. H. [et al.] 2B4 co-stimulation and dasatinib modulation enhance anti-CD19 CAR-NK-92 cell cytotoxicity // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16. — Art. 1675877. — doi: 10.3389/fimmu.2025.1675877.
486. Töpfer, K. [et al.] DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy // *J. Immunol.* — 2015. — Vol. 194. — P. 3201–3212. — doi: 10.4049/jimmunol.1400330.
487. Gong, Y. [et al.] Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy // *J. Hematol. Oncol.* — 2021. — Vol. 14. — Art. 73. — doi: 10.1186/s13045-021-01083-5.
488. Hawkins, E. R. Armored CAR T-Cells: The Next Chapter in T-Cell Cancer Immunotherapy / E. R. Hawkins, R. R. D'Souza, A. Klampatsa // *Biologics.* — 2021. — Vol. 15. — P. 95–105. — doi: 10.2147/BTT.S291768.
489. Granger, D. [et al.] A next generation inducible armored CAR to overcome the immunosuppressive tumor microenvironment and enhances cytotoxicity of CAR-T and TILs // *JCO.* — 2022. — Vol. 40. — Art. e14517. — doi: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e14517.
490. Christodoulou, I. [et al.] Engineering CAR-NK cells to secrete IL-15 sustains their anti-AML functionality but is associated with systemic toxicities // *J. Immunother. Cancer.* — 2021. — Vol. 9. — doi: 10.1136/jitc-2021-003894.
491. Okada, R. [et al.] GPC2-Targeted CAR T Cells Engineered with NFAT-Inducible Membrane-Tethered IL15/IL21 Exhibit Enhanced Activity against Neuroblastoma // *Cancer Immunol. Res.* — 2025. — Vol. 13. — P. 1363–1373. — doi: 10.1158/2326-6066.CIR-24-0975.
492. Smole, A. [et al.] Expression of inducible factors reprograms CAR-T cells for enhanced function and safety // *Cancer Cell.* — 2022. — Vol. 40. — P. 1470–1487. — doi: 10.1016/j.ccell.2022.11.006.
493. McKean, M. [et al.] Safety and early efficacy results from a phase 1 trial of PSMA-targeted armored CAR T cells in advanced mCRPC // *JCO.* — 2022. — Vol. 40. — Art. 94. — doi: 10.1200/JCO.2022.40.6_suppl.094.
494. Hanawa, H. Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors / H. Hanawa, D. A. Persons, A. W. Nienhuis // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79. — P. 8410–8421. — doi: 10.1128/JVI.79.13.8410-8421.2005.
495. Logan, A. C. [et al.] Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78. — P. 8421–8436. — doi: 10.1128/JVI.78.16.8421-8436.2004.
496. Kulemzin, S. V. [et al.] Modular lentiviral vector system for chimeric antigen receptor design optimization // *Russ. J. Bioorg. Chem.* — 2017. — Vol. 43. — P. 107–114. — doi: 10.1134/S1068162017020091.

497. Alter, G. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity / G. Alter, J. M. Malenfant, M. Altfeld // *J. Immunol. Methods.* — 2004. — Vol. 294. — P. 15–22. — doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008.
498. Bornego, F. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine bases / F. Bornego, J. Pena, R. Solana // *Hematol. Rev.* — 1993. — Vol. 7. — P. 115–124.
499. Ziegler, S. F. The activation antigen CD69 / S. F. Ziegler, F. Ramsdell, M. R. Alderson // *Stem Cells.* — 1994. — Vol. 12. — P. 456–465. — doi: 10.1002/stem.5530120502.
500. Vazquez, B. N. [et al.] CD69 gene is differentially regulated in T and B cells by evolutionarily conserved promoter-distal elements // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 183. — P. 6513–6521. — doi: 10.4049/jimmunol.090083.
501. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // *Nature.* — 2012. — Vol. 489. — P. 57–74. — doi: 10.1038/nature11247.
502. Zhao, B. The NF- κ B genomic landscape in lymphoblastoid B cells // *Cell Rep.* — 2014. — Vol. 8. — P. 1595–1606. — doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.037.
503. Gong, J. H. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells // *Leukemia.* — 1994. — Vol. 8. — P. 652–658.
504. He, K. Compact Bidirectional Promoters for Dual-Gene Expression in a Sleeping Beauty Transposon // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — Vol. 21, № 23. — Art. 9256. — doi: 10.3390/ijms21239256.
505. Khaniya, A. Development of a compact bidirectional promoter-driven dual chimeric antigen receptor (CAR) construct targeting CD19 and CD20 in the Sleeping Beauty (SB) transposon system // *J. Immunother. Cancer.* — 2024. — Vol. 12. — Art. 008555. — doi: 10.1136/jitc-2023-008555.
506. Guo, T. Sense-and-Respond Payload Delivery Using a Novel Antigen-Inducible Promoter Improves Suboptimal CAR-T Activation // *ACS Synth. Biol.* — 2022. — Vol. 11. — P. 1440–1453. — doi: 10.1021/acssynbio.1c00236.
507. Webster, B. Self-driving armored CAR-T cells overcome a suppressive milieu and eradicate CD19+ Raji lymphoma in preclinical models // *Mol. Ther.* — 2021. — Vol. 29. — P. 2691–2706. — doi: 10.1016/j.ymthe.2021.05.006.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Список использованных в работе лентивирусных плазмидных конструкций

Таблица 7.

Название	Структура интегрируемой кассеты
1. CD20-zeo	pCDH-EF1-CD20-IRES-zeo
2. CD20-red	pLVX-CMV-CD20-IRES-tdTomato
3. Nluc-GFP	pCDH-CMV-Nluc-EF1-copGFP
4. 2F2-CAR	pCDH-EF1a-mIgk-2F2scFv-CD8a(H+TM)-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
5. 1F5-CAR	pCDH-EF1a-mIgk-1F5scFv-CD8a(H+TM)-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
6. Leu16-CAR	pCDH-EF1a-mIgk-Leu16scFv-CD8a(H+TM)-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
7. FMC63-CAR	pCDH-EF1a-mIgk-FMC63scFv-CD8a(H+TM)-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
8. J591-CAR	pCDH-EF1a-mIgk-J591scFv-CD8a(H+TM)-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
9. dual CAR	pCDH-EF1a-FMC63-IgG4H-CD28TM-4-1BB-CD3 ζ -P2A-2F2-CD8H-CD28TM-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
10. dual CAR_2P	pCDH-EF1a-FMC63-IgG4H-CD28TM-4-1BB-CD3 ζ -CMV-2F2-CD8H-CD28TM-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
11. biCAR	pCDH-EF1a-mIgk-2F2(VH-VL)-FMC63-CD8aH-CD28TM-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
12. rev biCAR	pCDH-EF1a-mIgk-2F2(VL-VH)-FMC63-CD8aH-CD28TM-4-1BB-CD3 ζ -IRES-NGFR
13. Leu16-CAR (IgG1H)	pCDH-EF1a-mIgk-Leu16-IgG1H-CD28TM-CD28-CD3 ζ -IRES-zeo
14. CD69+ЭНХ	pCDH-as(reg-CD69-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP
15. CD69	pCDH-as(CD69-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP
16. 4xNFAT	pCDH-as(4xNFAT-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP
17. 30xNFkB	pCDH-as(30xNFkB-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP
18. 10xNFkB	pCDH-as(10xNFkB-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP
19. 5xNFkB	pCDH-as(5xNFkB-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP
20. 2xNFkB	pCDH-as(2xNFkB-NLS-mCherry-polyA)-MCS-EF1-copGFP