



УДК 602.9:615.47:577.21:616-006.04

СОВРЕМЕННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВАЛИДАЦИИ КЛИНИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 2025 г. Р. В. Мунгалов*, **, ***, #, Н. С. Ванд**,
Д. М. Чудаков*, **, ***, **, **, Е. А. Брюшкова*, **, ***, **

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

*** Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”,
факультет биологии и биотехнологии,
Россия, 117418 Москва, ул. Профсоюзная, 33/4

**** Московский государственный университет им. Ломоносова, кафедра молекулярной биологии,
Россия, 119234 Москва, ул. Ленинские горы, 1/12

***** Центр молекулярной и клеточной биологии, Россия, 121205 Москва, ул. Большой бульвар, 30/1

Поступила в редакцию 13.05.2025 г.

После доработки 27.05.2025 г.

Принята к публикации 28.05.2025 г.

Разработка терапевтических антиген-специфических Т-клеточных рецепторов (TCR) требует комплексной доклинической оценки их функциональной активности. Один из подходов при разработке новых препаратов для клеточной терапии на базе антиген-специфических Т-лимфоцитов заключается в модификации аутологичных Т-лимфоцитов эндогенными Т-клеточными рецепторами. В настоящей работе рассмотрены современные лабораторные платформы, применяемые для оценки ключевых характеристик TCR: формирования иммунологического синапса, специфичности связывания с антигеном и аффинности, активации сигнальных путей, продукции цитокинов и цитотоксического потенциала. Особое внимание уделено созданию модельных линий Т-клеток, экспрессирующих трансгенные TCR, оптимизации HLA-контекста клеток-мишеней и применению мультипараметрических технологий для анализа иммунного ответа. Обсуждаются перспективы использования 3D-органоидных моделей для оценки функциональной активности трансгенных TCR в условиях, приближенных к физиологическим, а также прогнозирования их клинической эффективности. Представленные подходы формируют основу для рационального отбора рецепторов-кандидатов в целях их последующего применения для иммунотерапии опухолей и лечения хронических инфекций.

Ключевые слова: Т-клеточные рецепторы, репортерные системы, иммунотерапия, клеточная терапия

DOI: 10.31857/S0132342325050017

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	732
2. КОМПОЗИЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СИНАПСА	732

Сокращения: TCR – Т-клеточный рецептор; МНС – главный комплекс гистосовместимости; CD – кластер дифференциации; HA-2 – минорный гистосовместимый антиген (mHAg); HLA – человеческий лейкоцитарный антиген; GFP – зеленый флуоресцентный белок; RFP – красный флуоресцентный белок; FITC – изотиоцианат флуоресцеина; PE – фикоэритрин; TILs – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии; NFAT – ядерный фактор активации Т-клеток; NF-κB – ядерный фактор κB; AP-1 – активирующий белок 1; IFN-γ – интерферон-гамма; TNF-α – фактор некроза опухоли-альфа.

Автор для связи: (эл. почта: mungalov.roman@yandex.ru).

2.1. Антиген-специфичный Т-клеточный рецептор	732
2.2. Корецептор CD4/CD8	734
2.3. HLA-контекст	735
3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ И АФФИННОСТЬ	736
4. АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ	736
5. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ	736
6. ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ	737
7. ОРГАНОИДНЫЕ МОДЕЛИ	739
8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	740
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	740

1. ВВЕДЕНИЕ

Современные подходы к TCR-T-терапии требуют комплексной проверки новых потенциально перспективных антиген-специфических Т-клеточных рецепторов (далее TCR), включая оценку их биологической активности на клеточных моделях, что обеспечивает внедрение молекул-кандидатов от теоретических разработок в клиническую практику. При оценке биологической активности TCR могут учитываться следующие параметры: 1) композиция иммунологического синапса (TCR, МНС, корецепторы); 2) специфичность связывания с мишенью и аффинность; 3) активация сигнальных путей, ответственных за формирование иммунного ответа; 4) секреция провоспалительных цитокинов; 5) цитотоксический потенциал (рис. 1).

Для экспериментальной оценки каждого из параметров функциональности TCR необходимы соответствующие условия и модели, некоторые из них (включая создание и применение) рассмотрены в настоящем обзоре.

2. КОМПОЗИЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СИНАПСА

2.1. Антиген-специфичный Т-клеточный рецептор

Ключевой этап разработки клеточной платформы для тестирования антиген-специфических TCR – создание трансгенной линии клеток, стабильно экспрессирующей целевой TCR. Чаще всего за основу берутся immortalized модельные Т-клеточные линии, как, например, Jurkat E6.1 и HuT78 [1]. Интеграция антиген-специфического Т-клеточного рецептора производится, как правило, при помощи лентивирусных векторов, однако

существуют и альтернативные способы, в том числе с применением транспозонов Sleeping Beauty совместно с микроРНК-опосредованным сайленсингом эндогенного рецептора. Такие Т-клетки демонстрируют эффективное уничтожение опухолевых клеток и секрецию цитокинов при антиген-специфической стимуляции [2].

Важный пункт разработки антиген-специфических модельных линий – устранение вклада эндогенных TCR- α/β -цепей, поскольку они могут конкурировать за сигнальный комплекс CD3, а также участвовать в перекрестном спаривании (mispairing) с цепями трансгенного рецептора за счет ассоциации константных доменов. В результате такой химерной димеризации наблюдаются следующие отрицательные последствия.

1) Снижение уровня целевого рецептора на поверхности клеток и уменьшение числа функциональных рецепторов. При трансдукции мышинных Т-лимфоцитов TCR, специфичных к овалбумину (OVA), была достигнута 56–60%-ная частота экспрессии соответствующих экзогенных α - и β -цепей [3]. При этом двойными положительными (экспрессирующими обе цепи) были только 27% клеток, и только 15% всех клеток продемонстрировали способность отвечать на антиген-специфичную стимуляцию посредством секреции IFN- γ в присутствии клеток-мишеней. Это коррелировало с уровнем окрашивания Т-лимфоцитов соответствующим МНС-тетрамером (10%) и косвенно свидетельствовало о высоком уровне химерной димеризации. Гетерогенность экспрессии трансдуцированных V α и V β , указывающая на химерную димеризацию цепей TCR, была также описана в другой работе [4] по трансдукции Т-клеток человека. Введение экзогенных α - и β -цепей TCR снижало интенсивность

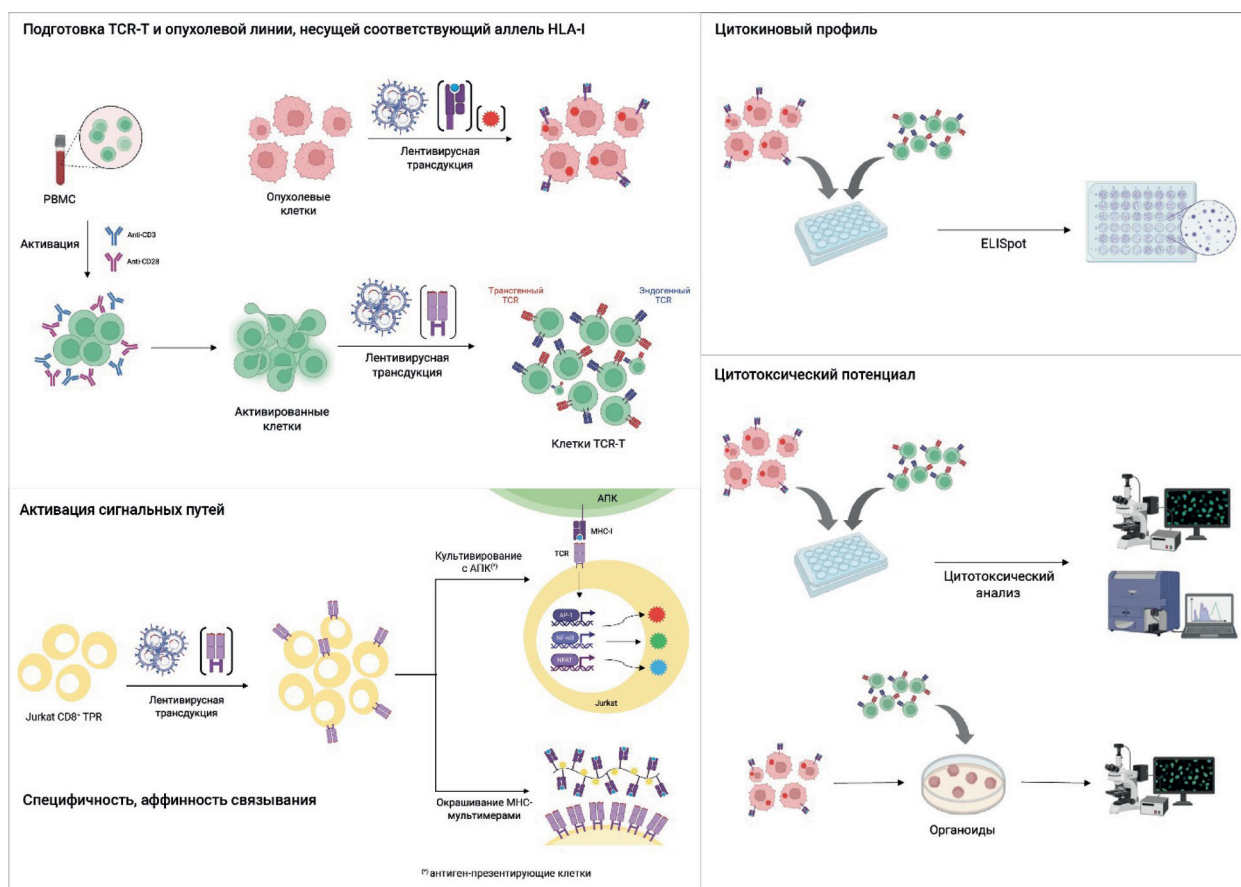


Рис. 1. Современные тест-системы для доклинической оценки Т-клеточных рецепторов.

окрашивания эндогенного рецептора МНС-тетрамером на 60–70%. При трансдукции обеих цепей уровень окрашивания снижался до 14% от исходного уровня.

2) Конкуренция химерных (mispaired) TCR с целевыми рецепторами за CD3. Хотя все цепи CD3 экспрессируются с 40–90%-ным избытком [5], рост авидности и противоопухолевой активности при параллельной трансдукции CD3 и TCR по сравнению с трансдукцией только одного TCR косвенно указывает на дефицит эндогенного CD3, выступающего в качестве ограничивающего фактора для TCR-T-клеток [6]. В экспериментах по трансдукции HA-2-специфического TCR в CMV-специфичные Т-лимфоциты было показано, что уровень представленности на поверхности клеток экзогенного HA-2-TCR и его специфическая цитотоксическая активность против HA-2-экспрессирующих клеток-мишеней определяются в том числе свойствами эндогенного TCR. Было показано, что Т-лимфоциты с одинаковой исходной специфичностью (CMV-TCR), но с различным

составом α - и β -цепей, отличавшиеся после трансдукции экзогенным HA-2-TCR разными уровнями его поверхностной экспрессии, также имели различные α - и β -цепи эндогенного CMV-TCR [4]. Уровень химерной димеризации сильно варьировал: в зависимости от состава эндогенного CMV-TCR снижение его представленности на поверхности клеток составляло 42–86% от исходного уровня при трансдукции одним и тем же экзогенным HA-2-TCR.

В отдельной серии экспериментов по трансдукции $\gamma\delta$ -Т-клеток было подтверждено, что низкий уровень экспрессии экзогенных TCR связан с конкуренцией за CD3: экзогенные TCR могут проигрывать эндогенным за связывание с CD3, при этом успех конкуренции за CD3 зависит от подсемейства V-сегментов α - и β -цепей. Авторы предположили, что некоторые цепи TCR имеют более высокое межцепочечное сродство, что дает им преимущество при образовании комплекса TCR-CD3 и экспрессии на поверхности клетки по сравнению с другими TCR.

3) Формирование рецепторов, не прошедших отрицательную селекцию, с высоким риском распознавания аутоантигенов. Летальная токсичность неправильно спаренных TCR была описана у мышей вследствие развития реакции трансплантата против хозяина (GvHD) [7]. Потенциальная аутореактивность Т-клеток с химерными TCR продемонстрирована также *in vitro* для клеток человека [8]. Из крови здоровых доноров получали линии различных вирус-специфических Т-клеток, которые затем трансдуцировали семью различными TCR с разной специфичностью. Реактивность оценивали в отношении панели клеток LCL, экспрессирующих преобладающие варианты МНС-I и МНС-II по продукции IFN- γ . В некоторых случаях неореактивность, возникающая в результате химерной димеризации, достигала уровня положительного контроля (эндогенного вирус-специфического TCR). Однако в исследовании, включающем 106 пациентов, получивших аутологичные Т-клетки, трансдуцированные различными вариантами противоопухолевых TCR

человеческого (4 варианта, 77 пролеченных пациентов) и мышиного (3 варианта, 29 пролеченных пациентов) происхождения, случаев GvHD выявлено не было [9]. Таким образом, этот риск на сегодняшний день в клинике не подтвержден.

В настоящее время при дизайне терапевтических TCR принято использовать различные подходы к снижению перекрестного спаривания: (1) использование мышиных последовательностей константных участков α - и β -цепей Т-клеточного рецептора [10]; (2) введение дополнительной дисульфидной связи [11]; (3) использование одноцепочечных конструкторов [12]; (4) переключение доменов (domain swapping) [13]; (5) замена константных регионов $\alpha\beta$ на $\gamma\delta$ [13]; (6) нокаут генов эндогенных цепей (CRISPR-Cas9 [14], РНК-интерференция [15]) [16]. В нашей лаборатории проводятся эксперименты как с химерными TCR, константные регионы которых заменены на мышиные, так и с клеточными линиями, нокаутированными по генам эндогенных цепей рецептора (рис. 2).

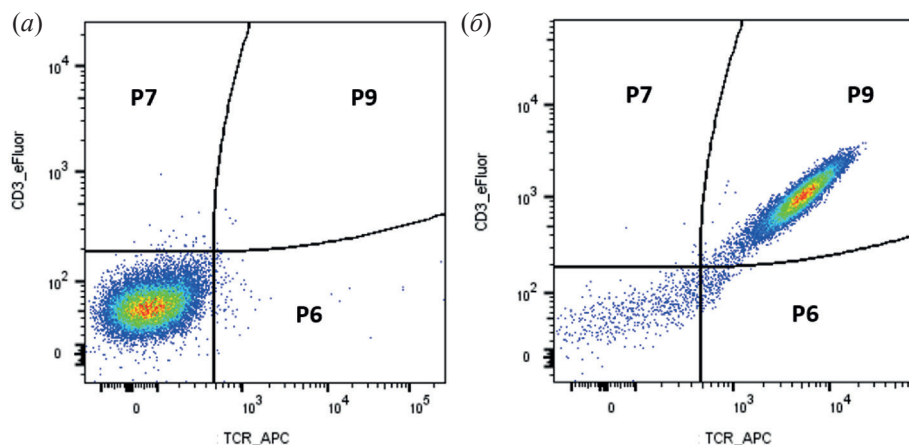


Рис. 2. Модельная линия Т-лимфоцитов Jurkat J76_TPR, нокаутированная по эндогенному TCR α - β [26]. (а) – Наблюдается отсутствие коэкспрессии CD3 (FITC) и TCR α - β (APC) (область P9) как единой структурно-организованной единицы [16] (собственные данные); (б) – та же линия после трансдукции трансгенным TCR (собственные данные).

2.2. Корцептор CD4/CD8

Важное условие формирования иммунологического синапса – экспрессия на поверхности Т-клетки корцепторов CD4 или CD8, которые определяют специфику иммунного ответа, будь то цитотоксическая реакция или модулирующая. CD4 связывается с МНС класса II, характерным для антиген-презентирующих клеток, а CD8 – с МНС класса I, что определяет специализацию Т-хелперов (CD4 $^{+}$) и цитотоксических Т-лимфоцитов

(CD8 $^{+}$). Это взаимодействие усиливает аффинность контакта, обеспечивая продолжительный сигнал, необходимый для активации Т-клетки [17].

Таким образом, важно учитывать наличие подходящего корцептора, экспрессируемого на поверхности модельной линии клеток. На рис. 3 представлена линия клеток Jurkat_TCR α - β _CD8 $^{+}$, нокаутированная по обеим цепям эндогенного рецептора и трансдуцированная CD8-корцептором при помощи лентивирусного трансгеноза.

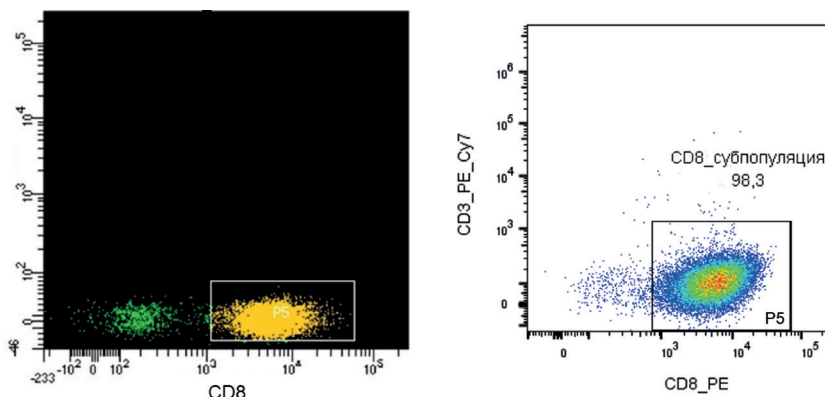


Рис. 3. Модельная линия Т-лимфоцитов Jurkat J76 $\text{TCR}^{\text{a-b-}}$, конститутивно экспрессирующая корецептор CD8. Область P5 обозначена рамкой (собственные данные).

2.3. HLA-контекст

Другой краеугольный камень антиген-специфического ответа TCR – правильный HLA-контекст, что означает презентацию иммунодоминантного антигена Т-клеткам определенным аллелем МНС. Перед тем как приступить к тестированию того или иного TCR, необходимо подготовить клетки-

мишени, модифицировав их подходящим для данного TCR HLA. На рис. 4 представлена гистограмма флуоресценции HLA-A03 в канале PE после лентивирусной трансдукции экспрессионной кассеты в геном линии клеток аденокарциномы поджелудочной железы Саран-2 (рис. 5).

Таким образом, модельная линия Саран-2 была подготовлена для тестирования TCR, специфич-

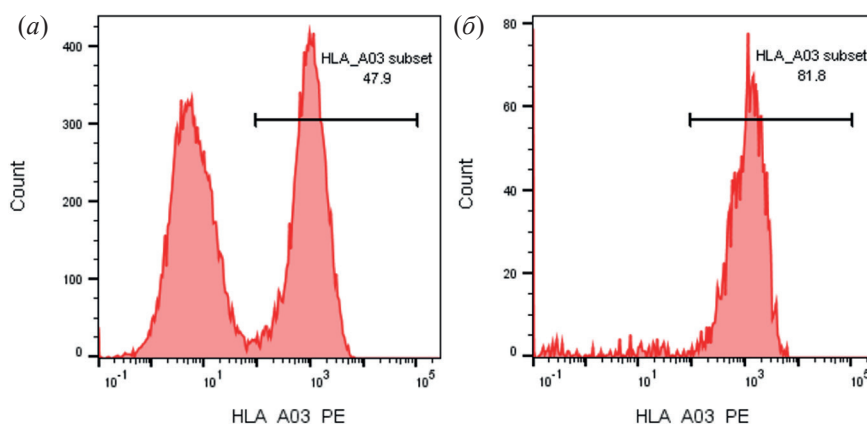


Рис. 4. Цитофлуоретрическая оценка обогащенной популяции HLA-A03^+ Саран-2, трансдуцированных pLBE-HLA-A03. Трансдукция (a) и селекция (б) на магнитных шариках Anti-PE MicroBeads (Miltenyi, Германия) (собственные данные).

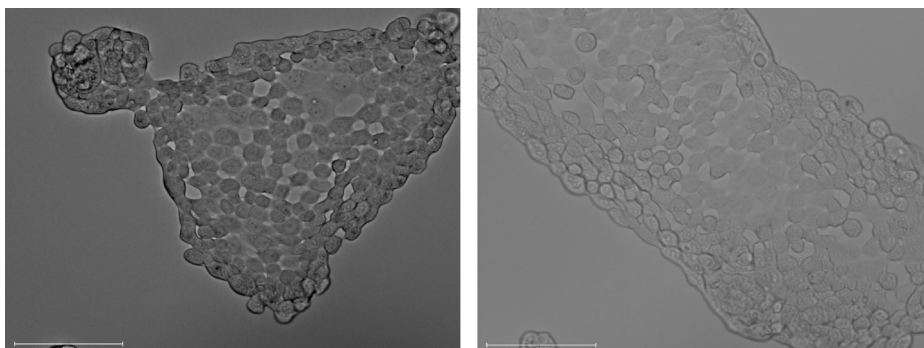


Рис. 5. Иммуортиализованная линия аденокарциномы поджелудочной железы человека Саран-2 (собственные данные). Масштабный отрезок – 150 мкм.

ного к определенным драйверам канцерогенеза (в частности, KRAS^{G12V}) [18] и распознающего эпитоп в контексте A*03. В свою очередь, дикий тип данной конкретной линии клеток экспрессирует аллель HLA-A*29:02, что не позволило бы рецептору распознать мутантный эпитоп и активировать Т-клетки.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ И АФФИННОСТЬ

Анализ с использованием рМНС-мультимеров позволяет количественно оценить связывание TCR с антигеном-мишенью в заданном HLA-контексте [19]. Исследования также показывают корреляцию интенсивности окрашивания мультимерами с аффинностью TCR к эпитопу и функциональной авидностью. Использование более чувствительных аналогов – декстримеров – позволяет детектировать даже слабоаффинные TCR [20]. Современные модификации также включают ДНК-баркодированные тетрамеры, совместимые с секвенированием единичных клеток (tetTCR-Seq), что повышает точность идентификации антиген-специфических клонов [21]. Алгоритмы машинного обучения, такие как TRTPred [22], позволяют предсказывать опухоль-реактивные TCR на основе данных секвенирования единичных клеток. Для проверки реальных TCR-рМНС и подтверждения специфичности связывания рецептора с эпитопом *in silico* также применяются такие модели, как ITRAP [23] или ICON [24].

4. АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Для изучения активации внутриклеточных сигнальных путей широко применяются репортерные системы на основе флуоресцентных. Например, клеточные линии Jurkat модифицируются конструкциями, в которых репортерный ген (*GFP*, *RFP*) находится под контролем промотора того или иного транскрипционного фактора иммунного сигнального пути [25]. Это позволяет регистрировать активацию TCR в режиме реального времени при взаимодействии с антиген-презентирующими клетками. На данный момент разрабатывается большое количество разных репортерных систем для различных целей. Например, для более точной и надежной оценки функциональности TCR создаются трехрепортерные линии, где в дополнение к NFAT добавляется контроль других факторов, участвующих

в иммунных сигнальных каскадах (NF-κB, AP-1) [26]. Флуоресцентные маркеры, активные в других каналах, также интегрируются в геном и экспрессируются под эндогенными промоторами генов соответствующих факторов [27].

5. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ

Важная характеристика функциональной активности Т-клеток – секреция провоспалительных цитокинов, таких как IFN-γ, TNF-α и IL-2. Для ее оценки применяют метод ELISpot, который позволяет детектировать продукцию цитокинов на уровне отдельных клеток. Модифицированные версии, такие как FluoroSpot, дают возможность одновременно анализировать до четырех различных цитокинов, что критично для определения полифункциональности Т-клеток [28].

Кроме того, с развитием технологий генетической модификации Т-клеток, таких как CAR- и TCR-модифицированные Т-клетки, особую актуальность приобрела задача оценки их цитокинового профиля в целях предсказания терапевтической эффективности и возможных токсических эффектов. Например, высокие уровни секреции IFN-γ и TNF-α часто ассоциированы с усиленной цитотоксичностью, но могут одновременно коррелировать с развитием цитокинового шторма (CRS). Поэтому количественная и качественная оценка продукции этих и других цитокинов становится важным критерием для доклинической оценки Т-клеточных рецепторов.

Современные лабораторные платформы включают мультиплексные системы для иммунологического анализа, такие как Luminex и Cytometric Bead Array (CBA), которые позволяют одновременно определять уровни десятков цитокинов в супернатантах культуры. Эти методы особенно полезны для системной оценки иммунного ответа, включая анализ IL-6, IL-10 и GM-CSF – ключевых медиаторов иммунной токсичности при Т-клеточной терапии. Как показано в работе Ghahri-Saremi et al. [29], генетическая модификация CAR-Т-клеток, направленная на устранение продукции GM-CSF или экспрессию анти-IL-6-рецепторов, может существенно снизить риск CRS и нейротоксичности без потери эффективности терапии.

Также отмечается роль IL-15, IL-7 и IL-21 (конститутивно посредством генной модификации или в виде добавок к питательным средам) в под-

держании менее дифференцированного состояния Т-клеток, ассоциированного с улучшенной персистенцией и цитокиновой полифункциональностью [29]. Тест-системы, направленные на измерение уровней этих цитокинов *in vitro*, позволяют судить о потенциале Т-клеточных рецепторов поддерживать долговременную противоопухолевую активность. Некоторые платформы также позволяют осуществлять мониторинг экспрессии индуцируемых цитокинов на уровне отдельных клеток с помощью внутриклеточной цитометрии по проточной методике.

Таким образом, цитокиновый профиль представляет собой не только маркер функциональности Т-клеток, но и важный инструмент прогностической оценки безопасности и эффективности перед клиническим применением рецептора. Интеграция высокопроизводительных тест-систем в ранние этапы валидации рецепторов TCR и CAR позволяет оптимизировать отбор кандидатов для последующего внедрения в клинику.

6. ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Наконец, финальный этап оценки функциональности новых терапевтических TCR на доклинических стадиях разработки – это проведение цитотоксических тестов, которые определяют потенциал TCR к антиген-специфическому уничтожению опухолевых клеток. Аналогично предыдущим этапам валидации TCR, проведение таких экспериментов возможно при создании специально модифицированных модельных опухолевых линий, экспрессирующих подходящий HLA-аллель, а также репортерные белки, для оценки

инволюции опухоли. Об оптимизации HLA-контекста под конкретный Т-клеточный рецептор было сказано выше. В свою очередь, создание репортерной клеточной линии представляет собой менее трудоемкую задачу по сравнению с подготовкой клеточных линий для активационных тестов. В случае с линиями, нацеленными на оценку эффекторной функции TCR, ген флуоресцентного белка (GFP, mCherry, tdTomato) встраивают в геном опухолевой линии под экзогенным промотором с целью обеспечения конститутивной экспрессии трансгена (рис. 6). При совместном культивировании с TCR-клетками снижение флуоресценции мишеней (например, уменьшение площади GFP⁺-клеток) напрямую коррелирует с их лизисом, что фиксируют методом конфокальной микроскопии или автоматизированным анализом изображений. Альтернативным способом оценки цитотоксической активности выступает мечение клеток-мишеней радиоактивными изотопами (например, ⁵¹Cr), которые интегрируются в мембрану клеток и высвобождаются при TCR-опосредованном лизисе. Для экспериментов *in vivo* обычно используют люминесцентно-меченые линии, получаемые путем трансдукции гена-репортера люциферазы в геном клеток-мишеней [30].

Для проведения цитотоксических тестов опухолевые клетки-мишени культивируют совместно с эффекторными клетками в различных соотношениях эффектор–мишень. Эффективность Т-клеточного рецептора оценивают по способности индуцировать специфический лизис опухолевых клеток, при этом для точности результатов важно контролировать ряд переменных. В современных цитотоксических тестах применяют многоцветные

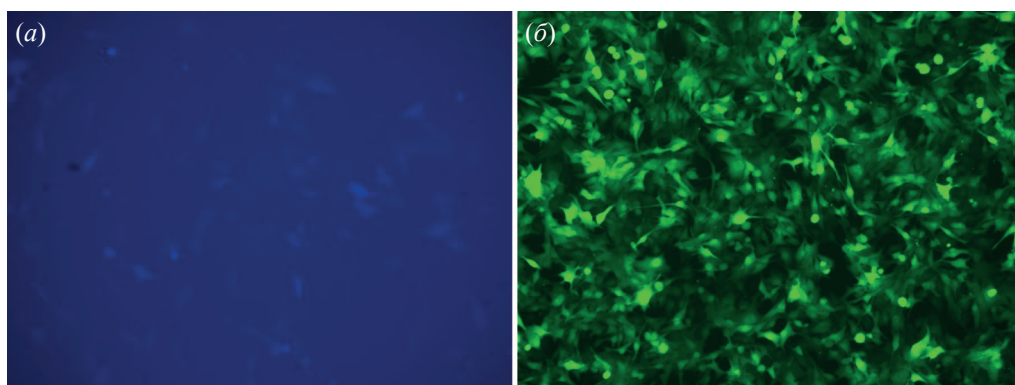


Рис. 6. Репортерная линия меланомы Sk-Mel-30, конститутивно экспрессирующая синий (а) и зеленый (б) флуоресцентные белки (собственные данные).

совместные культуры, в которых мишени и эффекторы маркируют разными флуоресцентными красителями (например, CFSE или CellTrace Violet для мишеней и eFluor 670 для Т-клеток), что позволяет отслеживать популяции отдельно и точно определять долю погибших клеток-мишеней [31]. После инкубации совместной культуры в течение 24–48 ч производят окрашивание на маркеры жизнеспособности (7-AAD, DRAQ7, Live/Dead Aqua) либо маркеры дегрануляции (например, CD107a [32]). Затем процент мертвых клеток-мишеней, а также дегранулированных эффекторных клеток анализируют при помощи проточной цитометрии.

Такие тесты часто проводят с внутренним контролем – например, мишени с неспецифическим HLA или без пептида, или со “скрытым” антигеном – это позволяет отсекал неспецифическую цитотоксичность или аллореактивность. Для исключения случайных отклонений в окрашивании или гибели от условий среды рекомендуется добавлять внутренний контроль, например, вторую линию мишеней, не экспрессирующую антиген и маркированную другим красителем. Эти подходы позволяют проводить параллельную оценку специфической и неспецифической гибели и повысить надежность измерений.

Для оценки цитотоксической активности Т-клеток в системах с пептидной пульсацией широко используются клетки линии T2. Эти клетки, дефицитные по транспортеру TAP, не способны эффективно представлять эндогенные пептиды, что делает их идеальными для загрузки экзогенных пептидов. Это позволяет минимизировать вариабельность презентации антигена и обеспечивает более контролируемые условия для оценки специфичности Т-клеточного ответа.

В исследовании Bossi et al. [33] была продемонстрирована возможность количественной оценки числа представленных эпитопов на поверхности T2-клеток, трансфицированных пептидами, с использованием высокоаффинных растворимых TCR и флуоресцентной микроскопии. Авторы показали, что при пульсации пептидами в низконаномолярных концентрациях (10^{-9} – 10^{-8} М) количество представленных эпитопов на T2-клетках сопоставимо с таковым на опухолевых клетках, что делает такие условия более физиологичными для оценки чувствительности Т-клеток к антигену.

Для повышения чувствительности цитотоксических тестов также применяются платформы с временной съемкой (микроскопия time-lapse), особенно в 3D совместных культурах. Такие подходы позволяют отслеживать взаимодействие эффекторных клеток и мишеней в реальном времени, включая продолжительность контакта, морфологические признаки апоптоза и кинетику гибели.

Была разработана платформа 3D-культуры с использованием срезов опухолевой ткани (3D-TSC) [34], позволяющая проводить временную съемку и количественную оценку ответа опухоли на противораковую терапию *ex vivo*. Авторы использовали сенсор C3, основанный на FRET, для мониторинга активности каспазы-3 в реальном времени, что обеспечило высокую чувствительность и точность в оценке апоптоза в 3D-культурах. Этот подход позволил выявить динамику апоптоза в ответ на лечение, что особенно важно при тестировании эффективности химиотерапевтических препаратов.

Наконец, ключевым этапом цитотоксических тестов TCR-кандидатов остается оценка выживаемости клеток-мишеней после взаимодействия с Т-клетками, экспрессирующими целевой TCR. Один из широко применяемых подходов – подсчет абсолютного числа оставшихся мишеней, нормализованный через добавление стандартизованных микросфер (counting beads), что позволяет контролировать объемные потери при обработке образцов и обеспечивает сопоставимость данных между пробами [35]. Такой метод особенно полезен при анализе редких популяций или при использовании многоцветных панелей с высокой загрузкой клеток.

Для углубленного анализа цитотоксичности все чаще применяют мультипараметрическую проточную цитометрию, позволяющую одновременно оценивать жизнеспособность мишеней, экспрессию маркеров апоптоза и активацию Т-клеток. Такие системы особенно важны при исследовании сложных микросред или опухолевых инфильтратов, где требуется точное разграничение специфических и неспецифических популяций. В частности, Simoni et al. [36] использовали масс-цитометрию для детального фенотипирования CD8⁺-TILs в опухолях легких и толстой кишки, обнаружив, что CD8⁺-TILs представляют собой гетерогенную популяцию клеток как внутри отдель-

ных опухолей, так и между пациентами. Они также выявили, что часть CD8⁺-TILs специфична к антигенам, не связанным с опухолью, таким как вирусы Эпштейн–Барр (EBV), цитомегаловирус человека (HCMV) или вирус гриппа, и что эти “клетки-свидетели” отличаются по фенотипу от опухоль-специфичных клеток, в частности отсутствием экспрессии CD39.

7. ОРГАНОИДНЫЕ МОДЕЛИ

Одно из перспективных направлений в разработке лабораторных платформ для валидации функциональности Т-клеточных рецепторов – использование трехмерных органоидных моделей, полученных из опухолевых тканей пациентов. Такие модели, в отличие от традиционных двумерных культур, сохраняют пространственную организацию, клеточный состав и гетерогенность опухоли, что делает их более значимыми для доклинической оценки иммунной терапии.

Органоиды, производные от опухолевых биопсий, поддерживают экспрессию тканеспецифичных антигенов, онкогенных драйверов и HLA-аллелей, что позволяет использовать их как платформу для функционального тестирования TCR, в частности для оценки специфичности, цитотоксичности и потенциальной кросс-реактивности. Важное преимущество – возможность генетической модификации органоидов, например, с помощью CRISPR/Cas9 или лентивирусной трансдукции можно изменять HLA-профиль, вводить модели мутаций (например, KRAS G12V, p53R175H) или встраивать флуоресцентные/люминесцентные репортеры для визуализации лизиса опухоли в режиме реального времени [37].

Функциональная совместная культура Т-клеток, экспрессирующих терапевтический TCR, с опухолевыми органоидами позволяет оценить такие параметры, как экспансия и инфильтрация эффекторных Т-клеток, продукция цитокинов (например, IFN- γ , TNF- α), специфический лизис опухолевых клеток (на основе изображения или репортеров), сохранение эпителиальной/стромальной структуры после воздействия Т-клеток.

Кроме того, модели на основе платформы “органoid на чипе” позволяют контролировать микросреду опухоли, включая гипоксию, градиенты питательных веществ и присутствие фибробластов или иммунных супрессоров, что делает их особенно актуальными для оценки персистенции и выживаемости TCR-Т-клеток [38].

В настоящее время такие системы активно развиваются и все чаще используются в рамках персонализированной иммунотерапии. Применение индивидуализированных органоидных моделей позволяет предсказать потенциальную клиническую эффективность того или иного TCR перед введением пациенту, а также минимизировать риск кросс-реактивности с нормальными тканями [39].

Наряду с онкологией, органоидные системы находят применение и в моделировании Т-клеточного иммунного ответа против хронических вирусных инфекций, таких как гепатит С (HCV). Ярким примером служит работа Natarajan et al. [40], которые разработали микрофлюидную культуру, сочетающую трехмерные органоиды печени, полученные из стволовых клеток взрослого человека, с HLA-A*02:01-совместимыми CD8⁺-Т-клетками, специфичными к иммунодоминантному эпитопу вирусного белка NS3 (KLVALGINAV). В этой системе органоиды встраивали в матрицу внеклеточного матрикса внутри центрального канала чипа, а Т-клетки подавали через фланговые каналы, имитируя физиологическую миграцию иммунных клеток к зараженной ткани.

Авторы продемонстрировали, что при трансфекции органоидов специфичным пептидом KLVALGINAV происходит селективное разрушение HCV-мимикрирующих органоидов, сопровождающееся миграцией Т-клеток, активацией (экспрессия IFN- γ , CD107a) и морфологическим разрушением 3D-структуры. Использование этого подхода позволяет не только регистрировать факт антиген-специфического взаимодействия, но и количественно оценивать кинетику и эффективность лизиса в зависимости от времени, плотности клеток и условий микросреды.

Ключевое достоинство представленной модели – возможность пространственно-временного отслеживания иммунных взаимодействий, а также адаптивность к индивидуализированным настройкам: можно использовать органоиды и Т-клетки от одного донора, тестировать разные эпитопы или вводить фармакологические ингибиторы для изучения иммунорегуляции. Кроме того, органоиды сохраняют полярность и экспрессию HLA класса I и рецепторов, необходимых для вирусной инфекции и представления антигена, что делает модель физиологически значимой заменой трансформированных линий, таких как Huh-7, лишенных функциональных интерфероновых путей и клеточной полярности.

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интеграция современных клеточных моделей, мультипараметрических методов анализа и трехмерных органоидных платформ существенно расширяет возможности доклинической валидации антиген-специфических Т-клеточных рецепторов. Комплексная оценка параметров, таких как специфичность, аффинность, цитокиновый профиль и цитотоксическая активность, позволяет более точно прогнозировать терапевтический потенциал TCR-кандидатов и минимизировать риски, связанные с кросс-реактивностью или недостаточной эффективностью. Применение органоидных моделей и технологий на чипах открывает перспективы для индивидуализированной оценки рецепторов в рамках пациент-специфической микросреды. Таким образом, развитие лабораторных тест-систем – ключевой этап на пути к внедрению TCR-терапии в клиническую практику.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – РВМ, ЕАБ, ДМЧ; экспериментальные работы – РВМ, ЕАБ, НСВ; написание статьи – РВМ, ЕАБ, НСВ; анализ данных – РВМ, ЕАБ, НСВ; администрирование проекта – ДМЧ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bartelt R.R., Cruz-Orcutt N., Collins M., Houtman J.C.D. // PLoS One. 2009. V. 4. P. e5430.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005430>

2. Clauss J., Obenaus M., Miskey C., Ivics Z., Izsvák Z., Uckert W., Bunse M. // Hum. Gene Ther. 2018. V. 29. P. 569–584.
<https://doi.org/10.1089/hum.2017.136>
3. Rubinstein M.P., Kadima A.N., Salem M.L., Nguyen C.L., Gillanders W.E., Nishimura M.I., Cole D.J. // J. Immunol. 2003. V. 170. P. 1209–1217.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1209>
4. Heemskerk M.H.M., Hagedoorn R.S., Van Der Hoorn M.A.W.G., Van Der Veken L.T., Hoogeboom M., Kester M.G.D., Willemze R., Falkenburg J.H.F. // Blood. 2007. V. 109. P. 235–243.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-013318>
5. Minami Y., Weissman A.M., Samelson L.E., Klausner R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 2688–2692.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2688>
6. Ahmadi M., King J.W., Xue S.A., Voisine C., Holler A., Wright G.P., Waxman J., Morris E., Stauss H.J. // Blood. 2011. V. 118. P. 3528–3537.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-346338>
7. Bendle G.M., Linnemann C., Hooijkaas A.I., Bies L., De Witte M.A., Jorritsma A., Kaiser A.D.M., Pouw N., Debets R., Kieback E., Uckert W., Song J.Y., Haaften J.B.A.G., Schumacher T.N.M. // Nat. Med. 2010. V. 16. P. 565–570.
<https://doi.org/10.1038/nm.2128>
8. Van Loenen M.M., De Boer R., Amir A.L., Hagedoorn R.S., Volbeda G.L., Willemze R., Van Rood J.J., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 10972–10977.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005802107>
9. Rosenberg S.A. // Mol. Ther. 2010. V. 18. P. 1744–1745.
<https://doi.org/10.1038/mt.2010.195>
10. Cohen C.J., Zhao Y., Zheng Z., Rosenberg S.A., Morgan R.A. // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 8878–8886.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1450>
11. Aggen D.H., Chervin A.S., Schmitt T.M., Engels B., Stone J.D., Richman S.A., Piepenbrink K.H., Baker B.M., Greenberg P.D., Schreiber H., Kranz D.M. // Gene Ther. 2012. V. 19. P. 365–374.
<https://doi.org/10.1038/gt.2011.104>
12. Wei F., Cheng X., Xue J.Z., Xue S. // Front. Immunol. 2022. V. 13. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.850358>
13. Bethune M.T., Gee M.H., Bunse M., Lee M.S., Gschweng E.H., Pagadala M.S., Zhou J., Cheng D., Heath J.R., Kohn D.B., Kuhns M.S., Uckert W., Baltimore D. // Elife. 2016. V. 5. P. 1–24.
<https://doi.org/10.7554/eLife.19095>

14. Stadtmauer E.A., Fraietta J.A., Davis M.M., Cohen A.D., Weber K.L., Lancaster E., Mangan P.A., Kulikovskaya I., Gupta M., Chen F., Tian L., Gonzalez V.E., Xu J., Jung I.Y., Melenhorst J.J., Plesa G., Shea J., Matlawski T., Cervini A., June C.H. // *Science*. 2020. V. 367. P. 1–20.
<https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
15. Okada S., Muraoka D., Yasui K., Tawara I., Kawamura A., Okamoto S., Mineno J., Seo N., Shiku H., Eguchi S., Ikeda H. // *Cancer Sci*. 2023. V. 114. P. 4172–4183.
<https://doi.org/10.1111/cas.15954>
16. Birnbaum M.E., Berry R., Hsiao Y.S., Chen Z., Shingu-Vazquez M.A., Yu X., Waghray D., Fischer S., McCluskey J., Rossjohn J., Walz T., Garcia K.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 17576–17581.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1420936111>
17. Li Y., Yin Y., Mariuzza R.A. // *Front. Immunol*. 2013. V. 4. P. 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00206>
18. Schumacher T.N., Schreiber R.D. // *Science*. 2015. V. 348. P. 69–74.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa4971>
19. Altman J.D., Moss P.A.H., Goulder P.J.R., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M. // *Science*. 1996. V. 274. P. 94–96.
<https://doi.org/10.1126/science.274.5284.94>
20. Dolton G., Zervoudi E., Rius C., Wall A., Thomas H.L., Fuller A., Yeo L., Legut M., Wheeler S., Attaf M., Chudakov D.M., Choy E., Peakman M., Sewell A.K. // *Front. Immunol*. 2018. V. 9. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01378>
21. Zhang S.Q., Ma K.Y., Schonnesen A.A., Zhang M., He C., Sun E., Williams C.M., Jia W., Jiang N. // *Nat. Biotechnol*. 2018. V. 36. P. 1156–1159.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4282>
22. Pétremand R., Chiffelle J., Bobisse S., Perez M.A.S., Schmidt J., Arnaud M., Barras D., Lozano-Rabella M., Genolet R., Sauvage C., Saugy D., Michel A., Huguenin-Bergienat A.L., Capt C., Moore J.S., De Vito C., Labidi-Galy S.I., Kandalaft L.E., Dangaj Laniti D., Harari A. // *Nat. Biotechnol*. 2024. V. 43.
<https://doi.org/10.1038/s41587-024-02232-0>
23. Povlsen H.R., Bentzen A.K., Kadivar M., Jessen L.E., Hadrup S.R., Nielsen M. // *Elife*. 2023. V. 12. P. 1–25.
<https://doi.org/10.7554/eLife.81810>
24. Zhang W., Hawkins P.G., He J., Gupta N.T., Liu J., Choonoo G., Jeong S.W., Chen C.R., Dhanik A., Dillon M., Deering R., Macdonald L.E., Thurston G., Atwal G.S. // *Sci. Adv*. 2021. V. 7. P. 1–12.
<https://www.science.org/>
25. Jahan F., Koski J., Schenkwein D., Ylä-Herttuala S., Göös H., Huuskonen S., Varjosalo M., Maliniemi P., Leitner J., Steinberger P., Bühring H.-J., Vetterlanta K., Korhonen M. // *Front. Mol. Med*. 2023. V. 3. P. 1070384.
<https://doi.org/10.3389/fmmed.2023.1070384>
26. Roskopf S., Leitner J., Paster W., Morton L.T., Hagedoorn R.S., Steinberger P., Heemskerk M.H.M. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. P. 17608–17619.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24807>
27. Jutz S., Leitner J., Schmetterer K., Doel-Perez I., Majdic O., Grabmeier-Pfistershammer K., Paster W., Huppa J.B., Steinberger P. // *J. Immunol. Methods*. 2016. V. 430. P. 10–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.007>
28. Janetzki S., Rueger M., Dillenbeck T. // *Cells*. 2014. V. 3. P. 1102–1115.
<https://doi.org/10.3390/cells3041102>
29. Ghahri-Saremi N., Akbari B., Soltantoyeh T., Hadjati J., Ghassemi S., Mirzaei H.R. // *Front. Immunol*. 2021. V. 12. P. 738456.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.738456>
30. Kiesgen S., Messinger J.C., Chintala N.K., Tano Z., Adusumilli P.S. // *Nat. Protoc*. 2021. V. 16. P. 1331–1342.
<https://doi.org/10.1038/s41596-020-00467-0>
31. Park L.M., Lannigan J., Jaimes M.C. // *Cytom. Part A*. 2020. V. 97. P. 1044–1051.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.24213>
32. Sudworth A., Dai K.Z., Vaage J.T., Kveberg L. // *Front. Immunol*. 2016. V. 7. P. 572.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00572>
33. Bossi G., Gerry A.B., Paston S.J., Sutton D.H., Hassan N.J., Jakobsen B.K. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. P. e26840.
<https://doi.org/10.4161/onci.26840>
34. Xing F., Liu Y.C., Huang S., Lyu X., Su S.M., Chan U.I., Wu P.C., Yan Y., Ai N., Li J., Zhao M., Rajendran B.K., Liu J., Shao F., Sun H., Choi T.K., Zhu W., Luo G., Liu S., Deng C.X. // *Theranostics*. 2021. V. 11. P. 9415–9430.
<https://doi.org/10.7150/THNO.59533>
35. Maecker H.T., McCoy J.P., Nussenblatt R. // *Nat. Rev. Immunol*. 2012. V. 12. P. 191–200.
<https://doi.org/10.1038/nri3158>
36. Simoni Y., Becht E., Fehlings M., Loh C.Y., Koo S.L., Teng K.W.W., Yeong J.P.S., Nahar R., Zhang T., Kared H., Duan K., Ang N., Poidinger M., Lee Y.Y., Larbi A., Khng A.J., Tan E., Fu C., Mathew R., Newell E.W. // *Nature*. 2018. V. 557. P. 575–579.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0130-2>

37. Dijkstra K.K., Cattaneo C.M., Weeber F., Chalabi M., van de Haar J., Fanchi L.F., Slagter M., van der Vel-den D.L., Kaing S., Kelderman S., van Rooij N., van Leerdam M.E., Depla A., Smit E.F., Hartemink K.J., de Groot R., Wolkers M.C., Sachs N., Snaebjornsson P., Voest E.E. // *Cell*. 2018. V. 174. P. 1586–1598.e12.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009>
38. Sontheimer-Phelps A., Hassell B.A., Ingber D.E. // *Nat. Rev. Cancer*. 2019. V. 19. P. 65–81.
<https://doi.org/10.1038/s41568-018-0104-6>
39. Neal J.T., Li X., Zhu J., Giangarra V., Grzesko-wiak C.L., Ju J., Liu I.H., Chiou S.H., Salahudeen A.A., Smith A.R., Deutsch B.C., Liao L., Zemek A.J., Zhao F., Karlsson K., Schultz L.M., Metzner T.J., Nadauld L.D., Tseng Y.Y., Kuo C.J. // *Cell*. 2018. V. 175. P. 1972–1988.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.021>
40. Natarajan V., Simoneau C.R., Erickson A.L., Me-yers N.L., Baron J.L., Cooper S., McDevitt T.C., Ott M. // *Open Biol*. 2022. V. 12. P. 210320.
<https://doi.org/10.1098/rsob.210320>

Modern Laboratory Test-Systems as Platforms for Validation of Clinically Promising T-Cell Receptors

R. V. Mungalov*, **, ***, #, N. S. Vand**,
D. M. Chudakov*, **, ***, **, and E. A. Bryushkova*, **, ****

E-mail: mungalov.roman@yandex.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University,
ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

*** National Research University “Higher School of Economics”, Faculty of Biology and Biotechnology,
ul. Profsoyuznaya 33/4, Moscow, 117418 Russia

**** Lomonosov Moscow State University, Department of Molecular Biology,
ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

***** Center for Molecular and Cellular Biology, ul. Bolshoy Bulvar 30/1, Moscow, 121205 Russia

The development of therapeutic antigen-specific T-cell receptors (TCRs) requires comprehensive preclinical validation of their functional activity. One of the approaches in the development of new drugs for cell therapy based on antigen-specific T lymphocytes is the modification of autologous T lymphocytes with endogenous T-cell receptors. The present work reviews modern laboratory platforms used to assess key TCR characteristics: immunological synapse formation, specificity and affinity of antigen binding, activation of signalling pathways, cytokine production and cytotoxic potential. Particular attention is paid to the creation of model T-cell lines expressing transgenic TCRs, optimisation of HLA context of target cells and application of multiparametric technologies for immune response analysis. The prospects of using 3D organoid models for validation of functional activity of transgenic TCRs under conditions close to physiological ones, as well as for predicting their clinical efficacy are discussed. The presented approaches form the basis for rational selection of candidate receptors for their subsequent application in immunotherapy of tumours and chronic infections.

Keywords: T-cell receptors, reporter systems, immunotherapy, cell therapy