Клиническая онкогематология. 2023;16(3):268–79

Clinical oncohematology. 2023;16(3):268–79

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

Классические и активирующие химерные антигенные рецепторы PD-1 как элемент мультитаргетного подхода в лечении гематологических и солидных новообразований

К.А. Левчук[1], А.А. Голдаева[2], Е.А. Столярова[3], П.А. Матейкович[4], А.Х. Валиуллина[5], Э.Р. Булатов[5], А.В. Петухов[1], А.А. Дакс[6], Н.А. Барлев[6], Е.В. Байдюк[6], Я.Г. Торопова[1]

[1] ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., д. 7/9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034

[3] ООО «Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем им. Сергея Березина», ул. Есенина, д. 1, корп. 3, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194354

[4] ООО «ХЕМА», ул. 4-я 8 Марта, д. 3, корп. 3, Москва, Российская Федерация, 125319

[5] ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ул. Кремлевская, д. 18, Казань, Российская Федерация, 420008

[6] ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

Classic and Activating Chimeric Antigen Receptors PD-1 as an Element of Multi-Target Approach to the Treatment of Hematological and Solid Neoplasms

KA Levchuk[1], AA Goldaeva[2], EA Stolyarova[3], PA Mateikovich[4], AKh Valiullina[5], ER Bulatov[5], AV Petukhov[1], AA Daks[6], NA Barlev[6], EV Baidyuk[6], YaG Toropova[1]

[1] VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

[2] Saint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya nab., Saint Petersburg, Russian Federation, 199034

[3] Dr. Sergey Berezin Medical Institute (MIBS), 1 korp. 3 Esenina ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 194354

[4] HEMA, 3 korp. 3 4th 8 Marta ul., Moscow, Russian Federation, 125319

[5] Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18 Kremlevskaya ul., Kazan, Russian Federation, 420008

[6] Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

РЕФЕРАТ

Цель. Создание анти-PD-L1 CAR T-эффекторов, несущих внеклеточный домен PD-1 в качестве антигенраспознающего участка, и исследование их цитолитической активности. Функциональная оценка анти-PD-L1 CAR T-эффекторов *in vitro* с перспективой применения в мультитаргетной терапии опухолевых новообразований.

Материалы и методы. Конструкция химерного антигенного рецептора PD-1 была создана с помощью молекулярного клонирования антигенраспознающего участка молекулы человеческого PD-1 (аминокислоты 12–170) в экспрессионный плазмидный вектор млекопитающих с добавлением активационного и костимулирующего доменов. Первичные Т-лимфоциты мононуклеарной фракции периферической крови здорового донора получены методом экспансии комбинации моноклональных антител по поверхностным маркерам CD3/CD28. Анти-PD-L1 CAR T-эффекторы получены путем лентивирусной трансдукции генома первичных Т-лимфоцитов здорового донора. Экспрессию химерного рецептора PD-1 и эффективность трансдукции оценивали методом проточной цитофлюориметрии. Специфическую цитотоксическую активность анти-PD-L1 CAR T-эффекторов

ABSTRACT

Aim. To generate anti-PD-L1 CAR-T effectors carrying extracellular domain PD-1 as antigen-recognizing site and to study their cytolytic activity as well as to functionally assess the anti-PD-L1 CAR-T effectors *in vitro* with a view to apply them in multi-targeted tumor therapy.

Materials & Methods. Chimeric antigen receptor PD-1 was constructed using molecular cloning of PD-1 antigen-recognizing region (12–170 amino acids) into mammalian expression plasmid vector adding activation and co-stimulatory domains. Primary T-lymphocytes of healthy donor peripheral blood mononuclear fraction were derived by expanding monoclonal antibody combination on surface markers CD3/CD28. Anti-PD-L1 CAR-T effectors were obtained by lentiviral transduction of primary T-lymphocyte genome of a healthy donor. Chimeric antigen receptor PD-1 expression and transduction efficiency were assessed by flow cytofluorometry. Specific cytotoxicity of the anti-PD-L1 CAR-T effectors was analyzed *in vitro* by means of real-time cytotoxicity assay (RTCA) with HeLa_PD-L1 target cell line co-cultivation. The level of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, and IL-17A was assessed by flow cytofluorometry using Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD, USA).

© 2023 практическая медицина

анализировали *in vitro* с помощью теста цитотоксичности в реальном времени (RTCA) при сокультивировании с клетками-мишенями линии HeLa_PD-L1. Содержание цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A оценивали методом проточной цитофлюориметрии с использованием набора Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD, США).
Результаты. Эффективность лентивирусной трансдукции и доля анти-PD-L1 CAR T-эффекторов составили 42 %. Специфичность цитотоксического ответа анти-PD-L1 CAR T-эффекторов при низком соотношении эффектора/опухоли (1:20) верифицирована снижением клеточного индекса (КИ) при сокультивировании с HeLa_PD-L1 (КИ = 0,738) в 1,5 раза по сравнению с контролем (КИ = 1,0645). Увеличение синтеза цитокинов IL-2 (1000 пг/мл), IL-6 (438,5 пг/мл), TNF-α (44 пг/мл), IFN-γ (1034 пг/мл) при сокультивировании с таргетной линией-мишенью HeLa_PD-L1 указывает на функциональность исследуемых клеток-эффекторов.
Заключение. Нами получен и проверен *in vitro* химерный антигенный рецептор против PD-L1. Анти-PD-L1 CAR T-лимфоциты специфически «узнают» и способствуют цитолизу опухолевых клеток-мишеней путем высокой секреции провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α, IL-6 и IL-2. Химерный антигенный рецептор PD-1 можно модифицировать в активирующий (CSR) делецией CD3ζ-домена и использовать совместно с другими CAR без прогнозируемой неспецифической токсичности.

Ключевые слова: CAR T-клеточная терапия, PD-1, анти-PD-L1 CAR T-эффекторы, микроокружение опухоли, мультитаргетная иммунотерапия.

Results. The efficiency of lentiviral transduction and the proportion of the anti-PD-L1 CAR-T effectors were 42 %. The specificity of cytotoxic response of the anti-PD-L1 CAR-T effectors with a low effector/tumor ratio (1:20) was verified during HeLa_PD-L1 co-cultivation by a 1.5-fold decrease in the cell index (CI = 0.738) versus control (CI = 1.0645). The increase in synthesis of cytokines IL-2 (1000 pg/mL), IL-6 (438.5 pg/mL), TNF-α (44 pg/mL), and IFN-γ (1034 pg/mL) during HeLa_PD-L1 target cell line co-cultivation confirms the functionality of the analyzed effector cells.
Conclusion. Anti-PD-L1 chimeric antigen receptor was constructed and tested *in vitro*. Anti-PD-L1 CAR-T lymphocytes specifically recognize and promote the cytolysis of tumor target cells by increased secretion of pro-inflammatory cytokines IFN-γ, TNF-α, IL-6, and IL-2. Chimeric antigen receptor PD-1 can be modified into chimeric switch receptor (CSR) by deleting CD3ζ-domain and can be used together with other CARs without predicted non-specific toxicity.

Keywords: CAR-T cell therapy, PD-1, anti-PD-L1 CAR-T effectors, tumor microenvironment, multi-targeted immunotherapy.

Получено: 8 февраля 2023 г.
Принято в печать: 3 июня 2023 г.

Received: February 8, 2023
Accepted: June 3, 2023

Для переписки: Ксения Александровна Левчук, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(951)680-79-60; e-mail: ksenialevchuk2@gmail.com

For correspondence: Kseniya Aleksandrovna Levchuk, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel.: +7(951)680-79-60; e-mail: ksenialevchuk2@gmail.com

Для цитирования: Левчук К.А., Голдаева А.А., Столярова Е.А. и др. Классические и активирующие химерные антигенные рецепторы PD-1 как элемент мультитаргетного подхода в лечении гематологических и солидных новообразований. Клиническая онкогематология. 2023;16(3):268–79.

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-3-268-279

For citation: Levchuk KA, Goldaeva AA, Stolyarova EA, et al. Classic and Activating Chimeric Antigen Receptors PD-1 as an Element of Multi-Target Approach to the Treatment of Hematological and Solid Neoplasms. Clinical oncohematology. 2023;16(3):268–79. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-3-268-279

ВВЕДЕНИЕ

Адоптивная иммунотерапия CAR T-клетками является одним из наиболее быстро развивающихся лечебных подходов при злокачественных новообразованиях. После официального одобрения первого CAR T-препарата практически ежегодно регистрировались новые CAR-T-клеточные продукты. В частности, в 2021 г. было зарегистрировано сразу пять CAR T-препаратов. К настоящему времени одобрено 8 различных препаратов (табл. 1). Следует отметить, что все упомянутые биомедицинские продукты показали высокую эффективность в терапии злокачественных лимфопролиферативных заболеваний [1]. Более 150 компаний во всем мире занимаются разработкой CAR T-продуктов. Насчитывается более 800 зарегистрированных клинических исследований. Наряду с исследованиями CAR T-клеток, применяемых в качестве монотерапии, увеличивается количество исследований с использованием CAR T-препаратов в комбинации с ингибиторами контрольных точек PD-1/PD-L1, а также с химиотерапией. Поскольку канцерогенез представляет собой сложный процесс, сопровождающийся формированием уникального клеточного микроокружения, необходимого для роста и резистентности опухоли, применение CAR T-клеток в комбинированной терапии направлено на преодоление ограничений адоптивной клеточной иммунотерапии и усиление ее эффективности (рис. 1).

Стандартная CAR T-клеточная терапия состоит из ряда последовательных этапов, включающих

Таблица 1. CAR T-клеточные продукты, одобренные FDA (США) и регуляторными органами КНР

Продукт CAR-T	Маркер-мишень	Компания	Заболевание	Первичная регистрация
Kymriah (тисагенлеклейсел)	CD19	Novartis	Рецидивы/рефрактерные В-ОЛЛ, ДВКЛ *de novo*, ДВКЛ как результат трансформации фолликулярной лимфомы, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, фолликулярная лимфома	2017 г.*
Yescarta (аксикабтаген силолейсел)	CD19	Gilead/Kite Pharma	Рецидивы/рефрактерные ДВКЛ, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, ДВКЛ как результат трансформации фолликулярной лимфомы, фолликулярная лимфома	2017 г.*
Teractus (брексукабтаген аутолейсел)	CD19	Gilead/Kite Pharma	Рецидивы/рефрактерные В-ОЛЛ, лимфома из клеток мантии	2020 г.*
Breyanzi (лизокабтаген маралейсел)	CD19	Bristol-Myers Squibb	Рецидивы/рефрактерные ДВКЛ, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, фолликулярная лимфома	2021 г.*
Abecma (идекабтаген виклейсел)	BCMA	Bristol-Myers Squibb/ Bluebird bio	Рецидивы/рефрактерное течение множественной миеломы	2021 г.*
FKC-876 (по лицензии Yescarta)	CD19	FosunKite	Рецидивы/рефрактерные ДВКЛ, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, ДВКЛ как результат трансформации фолликулярной лимфомы	2021 г.**
Carteyva (релмакабтаген аутолейсел)	CD19	JW Therapeutic	Рецидивы/рефрактерные ДВКЛ, фолликулярная лимфома	2021 г.**
Carvykti (цилтакабтаген аутолейсел)	BCMA	Legend biotech/ Janssen oncology	Рецидивы/рефрактерное течение множественной миеломы	2022 г.*

FDA — Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США; В-ОЛЛ — В-клеточный острый лимфобластный лейкоз; ДВКЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома.
* CAR T-клеточные продукты, одобренные FDA.
** CAR T-клеточные продукты, одобренные Национальным управлением медицинской продукции Китая.

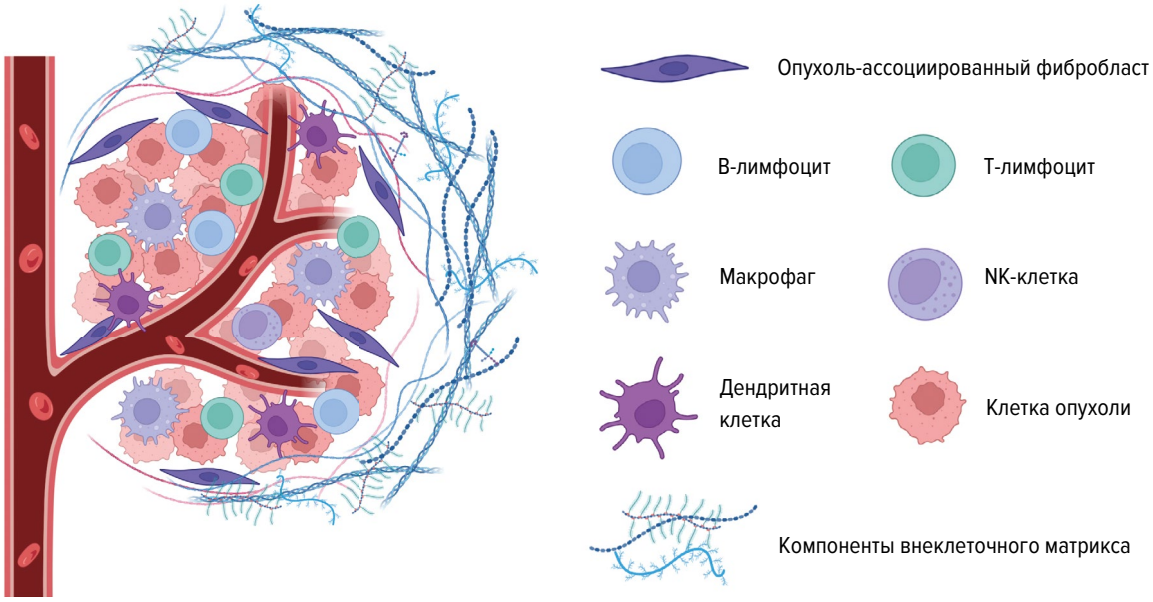

Рис. 1. Опухоль и компоненты ее микроокружения

Fig. 1. Tumor and components of its microenvironment

лимфодеплецию (кондиционирование) и инфузию генетически модифицированных Т-лимфоцитов. Цель этапа кондиционирования заключается в снижении опухолевой нагрузки и редукции регуляторных иммунных клеток, в особенности регуляторных Т-лимфоцитов. В свою очередь, Т-регуляторные лимфоциты, экспрессирующие как PD-L1, так и PD-1, способны контролировать толерантность пула Т-клеток [2] и подавлять функцию CAR Т-клеток. Последние помимо того, что оказывают цитотоксическое воздействие и стимулируют общий Т-клеточный ответ, рекрутируют компоненты неспецифического иммунитета. Очевидно, что удаление лимфоцитов является токсичным, но CAR Т-клеточная терапия у пациентов, не

получавших режим кондиционирования, оказывается неэффективной [3, 4]. Наиболее распространенными и эффективными являются режимы кондиционирования с использованием флударабина, циклофосфамида. В сравнении с монотерапией циклофосфамидом при применении комбинированной схемы лимфоделеции отмечались более высокие показатели пролиферации CAR T-клеток, длительная их персистенция, а также более высокая частота ответа на проводимую терапию. Кроме того, схемы кондиционирования могут варьировать и зависят от возможной резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам [5–7].

Помимо снижения опухолевой нагрузки некоторые противоопухолевые препараты могут способствовать смене иммунного статуса опухоли. Из резистентной, не способной быть инфильтрированной Т-лимфоцитами опухоль может перейти в активное иммуногенное состояние. Кроме того, статус иммунологически активной опухоли принято связывать с высоким уровнем экспрессии PD-L1, а резистентную к иммунотерапии опухоль — с низким уровнем экспрессии этого маркера. Относительно экспрессии PD-L2 сходных данных не представлено [8].

Механизм элиминации мишени CAR T-клетками реализуется в первую очередь за счет экспрессии цитокинов, а также благодаря образованию иммунного синапса с выделением гранзимов и перфоринов, который в отличие от Т-клеточного рецептора не структурирован [9]. В контексте CAR T-клеточной терапии наиболее упоминаемым и изучаемым является интерлейкин-6 (IL-6). Необходимо отметить, что высокий уровень экспрессии IL-6 может индуцироваться в микроокружении опухоли как под влиянием иммунного ответа, так и при воздействии противоопухолевых препаратов. В свою очередь, данный цитокин существенно влияет на иммунный ответ, поскольку непрерывный воспалительный ответ приводит к активации проонкогенных путей и истощению иммунных Т-клеток [10].

Недавние исследования причин полиорганной недостаточности у пациентов с COVID-19 и синдромом высвобождения цитокинов выявили два основных цитокина: интерферон-γ (IFN-γ) и фактор некроза опухолей-α (TNF-α), которые участвуют в программируемой гибели клеток, названной ПАНоптоз (PANoptosis) [11]. Экспрессия CAR T-клетками данных цитокинов и чувствительность к ним опухолевых клеток, согласно многочисленным исследованиям, необходимы для успешной CAR T-клеточной терапии. При недостаточной передаче сигналов TNF-α и IFN-γ эффективность противоопухолевого ответа снижается. В то же время мышиные модели с нокаутом гранзима и перфорина не демонстрируют значительного снижения эффективности противоопухолевого иммунитета [12–14]. Однако данные механизмы могут быть справедливы только в отношении солидных опухолей [15]. Кроме того, IFN-γ способен активировать экспрессию PD-L1, выступающего в качестве важного регулятора иммунного ответа со стороны не только опухолевых клеток, но и микроокружения [16, 17].

PD-L1 является лигандом рецептора программируемой гибели-1 (PD-1) и экспрессируется на поверхности иммунных клеток (дендритных, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов), а также гиперэкспрессируется на поверхности опухолевых клеток. PD-1 — распространенный иммуносупрессивный белок, встречающийся на поверхности активированных Т-лимфоцитов, дендритных клеток, моноцитов. Взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандом PD-L1 приводит к развитию иммунной толерантности, благодаря чему осуществляется механизм защиты клеток от аутоиммунных поражений. При взаимодействии рецептора PD-1 с лигандом PD-L1 на поверхности опухолевых клеток происходит ингибирование пролиферации PD-1-позитивных иммунных клеток, что приводит к уклонению опухолевых клеток от иммунного ответа.

Открытие и исследование сигнального пути PD-1/PD-L1 обусловили появление моноклональных антител — ингибиторов контрольных точек (ИКТ) иммунного ответа, которые стали значимым этапом в лечении опухолевых заболеваний (табл. 2) [18, 19]. Благодаря иммунному редактированию применение ИКТ стимулирует и усиливает иммунный ответ, блокируя взаимодействия PD-1/PD-L1. В настоящее время терапия, направленная на PD-1 и его лиганд PD-L1, является наиболее широко исследуемой областью в онкоиммунологии. Моноклональные антитела против PD-1/PD-L1 применяются при многих опухолевых заболеваниях, таких как меланома, рак легкого, лимфомы, колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, рак шейки матки, почки, желудка, молочной железы, и ряде других злокачественных новообразований. Терапия ИКТ в качестве адъювантной или неоадъювантной дает заметный, однако недостаточный эффект. Частота клинического ответа при лечении ИКТ достигает не более 40 %. Применение моноклональных антител против PD-1/PD-L1 у пациентов с прогрессированием или рецидивами злокачественных новообразований демонстрирует увеличение показателей выживаемости в сравнении с результатами лечения по стандартным схемам противоопухолевой терапии, однако частота полного клинического ответа остается низкой и не превышает 15 % [20, 21].

Недостаточная эффективность терапии ИКТ с низкой частотой ответа связана с рядом факторов, в т. ч. с уменьшением интенсивности инфильтрации опухоли Т-клетками [21]. Кроме того, чувствительность к иммунотерапии может значительно варьировать в зависимости от гетерогенности опухоли, механизма презентации антигена или активации различных сигнальных путей, приводящих к клеточной гибели [22].

Для повышения эффективности адоптивной иммунотерапии возможны следующие лечебные подходы: 1) комбинированная терапия с использованием разных ИКТ [23]; 2) комбинированная терапия с применением онколитических вирусов, способствующих лимфоцитарной инфильтрации и переходу опухоли в активное иммуногенное состояние [24]; 3) локальная термоабляционная терапия (например, радиочастотная абляция), химио- и лучевая терапия [25]. В последние годы также стало актуальным воздействие на сенесцентные (стареющие) клетки опухолевого микроокружения [26–28].

Таблица 2. Основные моноклональные антитела — ингибиторы иммунных контрольных точек

Мишень	Препарат	Заболевание
PD-1	Ниволумаб*	Меланома, лимфома Ходжкина, НМРЛ, гепатоцеллюлярный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, уротелиальный рак, колоректальный рак, рак желудка (аденокарцинома), рак пищевода (аденокарцинома, плоскоклеточный рак), почечноклеточный рак
PD-1	Пембролизумаб*	Меланома, НМРЛ, лимфома Ходжкина, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, уротелиальный рак, злокачественные новообразования с высоким уровнем микросателлитной нестабильности, рак желудка (HER2-позитивная аденокарцинома), рак шейки матки (с экспрессией PD-L1), плоскоклеточный рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, почечноклеточный рак, рак эндометрия, плоскоклеточный рак кожи, тройной негативный рак молочной железы (с экспрессией PD-L1)
PD-1	Достарлимаб*	Рак эндометрия, солидные опухоли с дефицитом системы репарации неправильно спаренных пар оснований (dMMR)
PD-1	Цемиплимаб*	Плоскоклеточный рак кожи, базальноклеточный рак кожи, НМРЛ
PD-1	Тислелизумаб	Плоскоклеточный рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, НМРЛ, назофарингеальный рак, лимфома Ходжкина, уротелиальный рак (с экспрессией PD-L1)
PD-1	Торипалимаб	Меланома, назофарингеальный рак, уротелиальный рак
PD-1	Пенпулимаб	Лимфома Ходжкина, назофарингеальный рак, НМРЛ
PD-L1	Атезолизумаб*	Уротелиальный рак, НМРЛ, гепатоцеллюлярный рак, меланома, мелкоклеточный рак легкого
PD-L1	Авелумаб*	Рак из клеток Меркеля, уротелиальный рак, почечноклеточный рак
PD-L1	Дурвалумаб*	НМРЛ, мелкоклеточный рак легкого, рак желчных протоков
CTLA-4	Ипилимумаб*	Меланома, почечноклеточный рак, НМРЛ, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, мезотелиома плевры, плоскоклеточный рак пищевода
CTLA-4	Тремелимумаб*	НМРЛ при отсутствии мутаций в гене *EGFR* или *ALK*-аберраций, гепатоцеллюлярный рак

НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого.
* Ингибиторы иммунных контрольных точек, одобренные Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA).

Таблица 3. Клинические исследования анти-PD-L1 CAR T-клеточной терапии в 2022 г.

Мишень/тип CAR T-клеточного продукта	Заболевание	Идентификационный номер клинического исследования
VEGFR1 и PD-L1 CAR-T	Злокачественные новообразования с плевральными или перитонеальными метастазами	NCT05477927
PD-L1, облученные CAR-NK	Рецидивы и метастазы рака желудка или плоскоклеточного рака головы и шеи	NCT04847466
HER2 и PD-L1 (CSR) CAR-T	Рак (HER2-позитивный) с плевральными или перитонеальными метастазами	NCT04684459
c-Met/PD-L1 CAR-T	Гепатоцеллюлярный рак	NCT03672305
MC-19PD1 CAR-T	Рецидивы или рефрактерное течение В-клеточной лимфомы	NCT03932955
PD-1/CD28 (CSR) CD19 CAR-T	Рецидивы или рефрактерное течение диффузной В-крупноклеточной лимфомы	NCT04850560

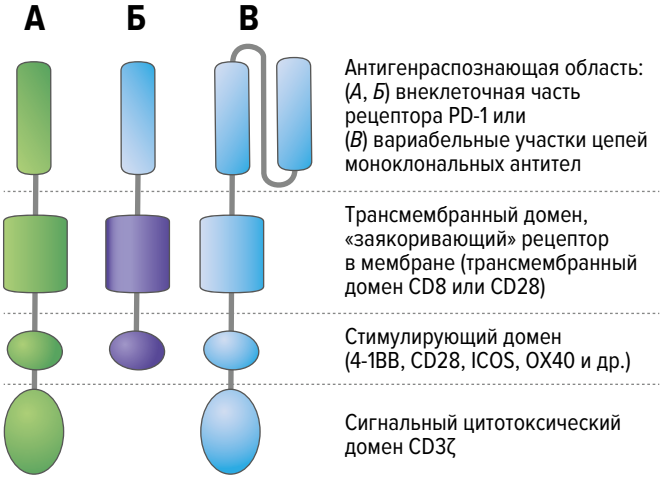

Рис. 2. Типы химерных рецепторов анти-PD-L1:
А — PD-1-основанный химерный антигенный рецептор (CAR); *Б* — PD-1-основанный химерный активирующий рецептор (CSR); *В* — классический CAR, основанный на моноклональных антителах

Fig. 2. Types of anti-PD-L1 chimeric receptors:
А — PD-1-based chimeric antigen receptor (CAR); *Б* — PD-1-based chimeric switch receptor (CSR); *В* — monoclonal antibody-based classic CAR

Благодаря высокой клинической и фундаментальной значимости PD-L1 стал прямой мишенью для CAR T-клеток. К настоящему времени известно о 6 клинических исследованиях терапии солидных новообразований и В-клеточных лимфом с применением анти-PD-L1 CAR T-клеток (табл. 3).

В клинической практике могут использоваться различные варианты химерных антигенных рецепторов PD-L1, начиная от уже ставших классическими CAR на основе моноклональных антител и менее распространенных, но неиммуногенных и сопоставимо эффективных CAR-основанных до своеобразного переключателя ингибирующего сигнала рецептора PD-1 в активирующий сигнал 4-1BB, CD28 и др. (рис. 2). Такой переключатель пока не имеет русскоязычного обозначения и называется нами химерным активирующим рецептором. Дословный перевод с

английского — химерный переключающий рецептор (chimeric switch receptor, CSR) [29].

Идея использования в иммунотерапии активирующих Т-клетки молекул в противовес ингибированию контрольных точек принадлежит одному из корейских ученых, внесших вклад в открытие 4-1BB [30]. Byoung S. Kwon и соавт. получили 50%-ю частоту ответов у пациентов с поздней стадией NK/T-клеточных лимфом, положительных на вирус Эпштейна—Барр, при применении противоопухолевых Т-лимфоцитов 4-1BB. В 2019 г. данный подход был назван новой парадигмой в терапии опухолевых заболеваний. При этом активирующий рецептор CSR, используемый при CAR Т-терапии, может не просто стимулировать Т-клетки по сигнальному пути 4-1BB, но и использовать иммуносупрессивное опухолевое микроокружение в качестве активирующего, тем самым повышая эффективность противоопухолевой терапии (рис. 3) [31, 32].

Таким образом, необходимость сложных разнонаправленных лечебных подходов обусловлена существованием четырехстороннего взаимодействия следующих составляющих: опухоль, опухолевое микроокружение, CAR Т-клетки и иммунная система. Резистентность опухоли к проводимой терапии также не является результатом одного генетического изменения и обусловлена рядом патогенетических механизмов канцерогенеза.

В настоящей работе мы фокусируемся на контрольной точке PD-1/PD-L1 и новом подходе к ее модуляции напрямую CAR Т-клетками, не забывая о чрезвычайной сложности взаимодействий внутри опухоли. Нами выполнен дизайн молекулы CAR, специфичной к PD-L1, и проверена ее активность *in vitro* с использованием генно-инженерных моделей и CAR Т-лимфоцитов. Мы не только приводим полную аминокислотную последовательность анти-PD-L1 CAR, но и справедливо предполагаем его возможную простую модернизацию в активирующий рецептор (CSR).

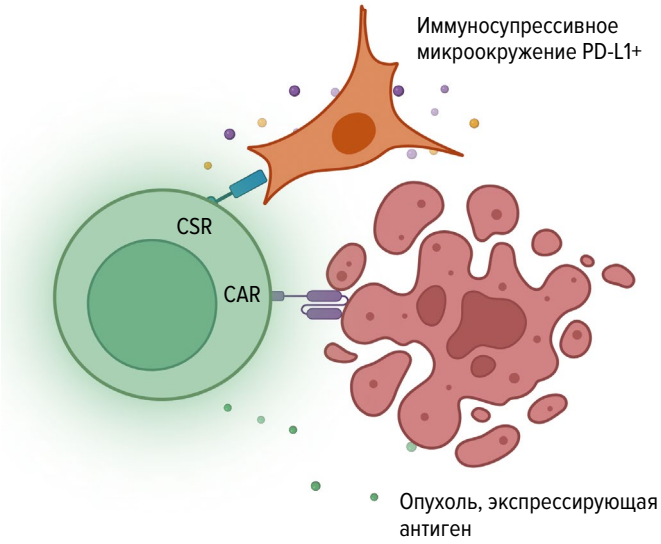

Рис. 3. Концепция одновременного использования активирующего и классического химерных рецепторов в терапии опухолей

Fig. 3. The concept of simultaneous use of chimeric switch receptor and classic chimeric receptor in tumor therapy

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн молекулярной последовательности исследуемого химерного антигенного рецептора PD-L1/2 включал сигнальный пептид CSF2RA, участок внутриклеточного домена PD-1, участок внутриклеточного домена CD28, участок цитоплазматического домена CD3ζ. Последовательность химерного антигенного рецептора PD-L1/2 клонировали в экспрессионный лентивирусный плазмидный вектор, полученный и использованный ранее [33] по сайтам рестрикции AgeI и EcoRI с удалением репортерного белка FusionRed. Полная нуклеотидная последовательность анти-PD-L1/2 CAR с необходимыми сайтами для молекулярного клонирования была синтезирована в компании «Евроген» (Россия).

Лентивирусные векторы собирались методом транзиентной котрансфекции несущей CAR плазмидной ДНК и упаковочных плазмид в клетках линии HEK293T по описанному ранее протоколу с последующей ультрафильтрацией [34].

Для активации первичных Т-лимфоцитов мононуклеарная фракция была получена центрифугированием в градиенте 1,077 г/см^3 фиколла («ПанЭко», Россия) из периферической крови здорового донора. До этапа трансдукции 5 млн мононуклеарных клеток активировали в 4 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) в течение 72 ч в присутствии моноклональных антител Immunocult CD3/CD28 (STEMCELL Technologies, Канада), 10 % FBS (Himedia, Индия), 100 ЕД/мл пенициллина-стрептомицина, 1000 МЕ/мл IL-2 («Биотех», Россия). После активации Т-лимфоциты инкубировали с лентивирусным вектором анти-PD-L1 CAR в полной ростовой среде, содержащей 50 мкг/мл протамина сульфата («Эллара», Россия) в течение 5 ч. Спустя 5 ч лентивирусной трансдукции Т-лимфоциты рассевали в объем свежей культуральной среды и проводили экспансию полученных клеток в течение 72 ч. Эффективность трансдукции и получения CAR Т-клеток оценивали перед сокультивированием с опухолевыми клетками-мишенями методом проточной цитометрии по интенсивности флюоресценции FITC с использованием антител, специфичных к PD-1 человека (BD, США).

Опухолевые клеточные линии были получены трансдукцией лентивирусного вектора, несущего PD-L1, в клетки линии аденокарциномы HeLa для создания специфичной мишени и трансдукцией лентивирусного вектора, несущего только репортерный белок mCherry, в контрольные клетки HeLa. Генетическую модификацию Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии по интенсивности флюоресценции FITC с помощью антител к PD-L1 человека (BD, США).

Для анализа цитотоксической активности полученных анти-PD-L1 CAR Т-лимфоцитов осуществляли их сокультивирование с клетками-мишенями опухоли в соотношении эффектора/опухоли (E/T), равном 1:20 (1 CAR Т-клетка на 20 опухолевых). Цитотоксичность CAR Т-эффекторов оценивали по изменению клеточного индекса (КИ) системы xCELLigence — метод RTCA (цитотоксичность в режиме реального времени).

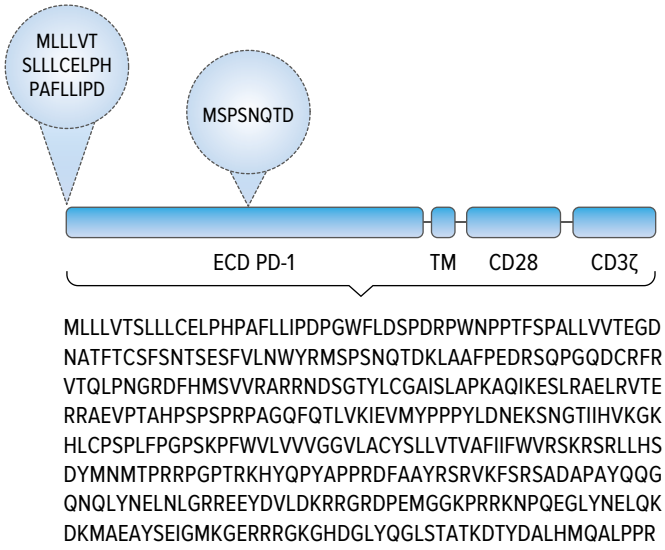

Рис. 4. Схематическое изображение молекулярного устройства и аминокислотная последовательность молекулы анти-PD-L1 CAR. В круге обозначены аминокислоты сигнального пептида и участка связывания с PD-L1 слева направо

Fig. 4. A schematic diagram of molecular structure and amino acid sequence of anti-PD-L1 CAR molecule. Amino acids of the signal peptide and PD-L1 binding site are highlighted in a circle from left to right

Экспрессию цитокинов и функциональность иммунного ответа CAR T-клеток оценивали в супернатанте методом проточной цитометрии также с соотношением E/T 1:20 после 48 ч коинкубации по протоколу и с применением коммерческого набора Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный дизайн химерного антигенного рецептора PD-L1

Полученный анти-PD-L1 химерный антигенный рецептор (CAR) был основан на последовательности рецептора PD-1 человека, а также на участке внеклеточного домена костимулирующей молекулы CD28 и участке цитоплазматического домена молекулы корецепторного комплекса T-клеточного рецептора CD3ζ. Сигнальный пептид на N-конце синтетического белка (аминокислотная последовательность MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPD) был взят из кодирующего участка рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF2RA). Наличие таких сигнальных пептидов позволяет принять химерным синтетическим конструкциям необходимую исследователям ориентацию и, как правило, является обязательной составляющей классического дизайна молекулы CAR.

В качестве антигенраспознающего домена CAR были выбраны аминокислоты 21–170 рецептора PD-1 человека. Таким образом, изучаемый домен содержит участок взаимодействия с PD-L1 — аминокислотная последовательность MSPSNQTD [35], а также эпитопы связывания ниволумаба (LDSPDRPWNP) [36] и пембролизумаба (NQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQ) [37]. Последовательность спейсер-шарнира (hinge region), иногда используемая для гибкости антигенраспознающего домена CAR, в данной конструкции отсутствовала. Трансмембранный и костимулирующий домены были выбраны как участок молекулы CD28, на C-конце находился цитоплазматический домен CD3ζ (рис. 4).

Оценка уровня экспрессии химерного антигенного рецептора PD-1

Для создания CAR T-клеток, несущих химерный антигенный рецептор PD-1, использовали T-клетки, выделенные из фракции мононуклеаров здорового донора с клеточным соотношением CD4+ 24 % и CD8+ 60 % (рис. 5, *А*). Полученные лентивирусные частицы на основе созданной целевой конструкции трансдуцировали первичные T-лимфоциты с эффективностью более 20 %. Эффективность трансдукции и получения CAR T-клеток оценивали по иммунофлюоресценции рецептора PD-1 на поверхности цитоплазматической мембраны эффекторов (рис. 5, *Б*). Для верификации специфической цитотоксической активности исследуемых анти-PD-1 CAR T-клеток была создана модельная клеточная линия-мишень HeLa с конститутивной экспрессией PD-L1 (рис. 5, *В*).

Оценка специфической цитотоксической активности клеток-эффекторов CAR-T PD-1

Для исследования специфического цитотоксического эффекта полученных анти-PD-L1 CAR T-эффекторов их сокультивировали с клетками-мишенями линии HeLa в течение 48 ч в соотношении E/T 1:20. В качестве отрицательных контролей специфичности CAR использовали опухолевую клеточную линию HeLa, лишенную модификаций. Сокультивирование мишеней с T-клетками выполняло роль оценки неспецифического ответа эффекторов на опухоль. Несмотря на низкое отношение клеток-эффекторов к клеткам-мишеням, сокультивирование исследуемых анти-PD-L1 CAR T-эффекторов инициирует цитолиз HeLa_PD-L1 и снижение КИ. Это доказывает специфичность разработанного химерного рецептора PD-1 к лиганду, экспрессируемому на опухолевых клетках (рис. 6, *А, Б*). При добавлении клеток-эффекторов CAR-T наблюдается закономерное снижение КИ в 1,5 раза по сравнению с контрольными точками без сокультивирования и с сокультивированием мишени с T-клетками без модификации (рис. 6, *В*).

Согласно результатам, обнаруженное снижение КИ при сокультивировании эффекторов CAR-T и линии HeLa_PD-L1 (КИ = 0,738) по сравнению с контролем (КИ = 1,0645) доказывает специфичность полученной молекулы химерного антигенного рецептора PD-1, а также наличие цитотоксического эффекта у исследуемых CAR T-эффекторов.

Оценка функциональности специфического цитотоксического ответа анти-PD-L1 CAR T-эффекторов

Для оценки функциональности специфической цитотоксической активности исследуемых анти-PD-L1 CAR T-эффекторов было проанализировано содержание основных цитокинов — медиаторов иммунного ответа: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A (рис. 7). Для анализа с помощью проточной ци-

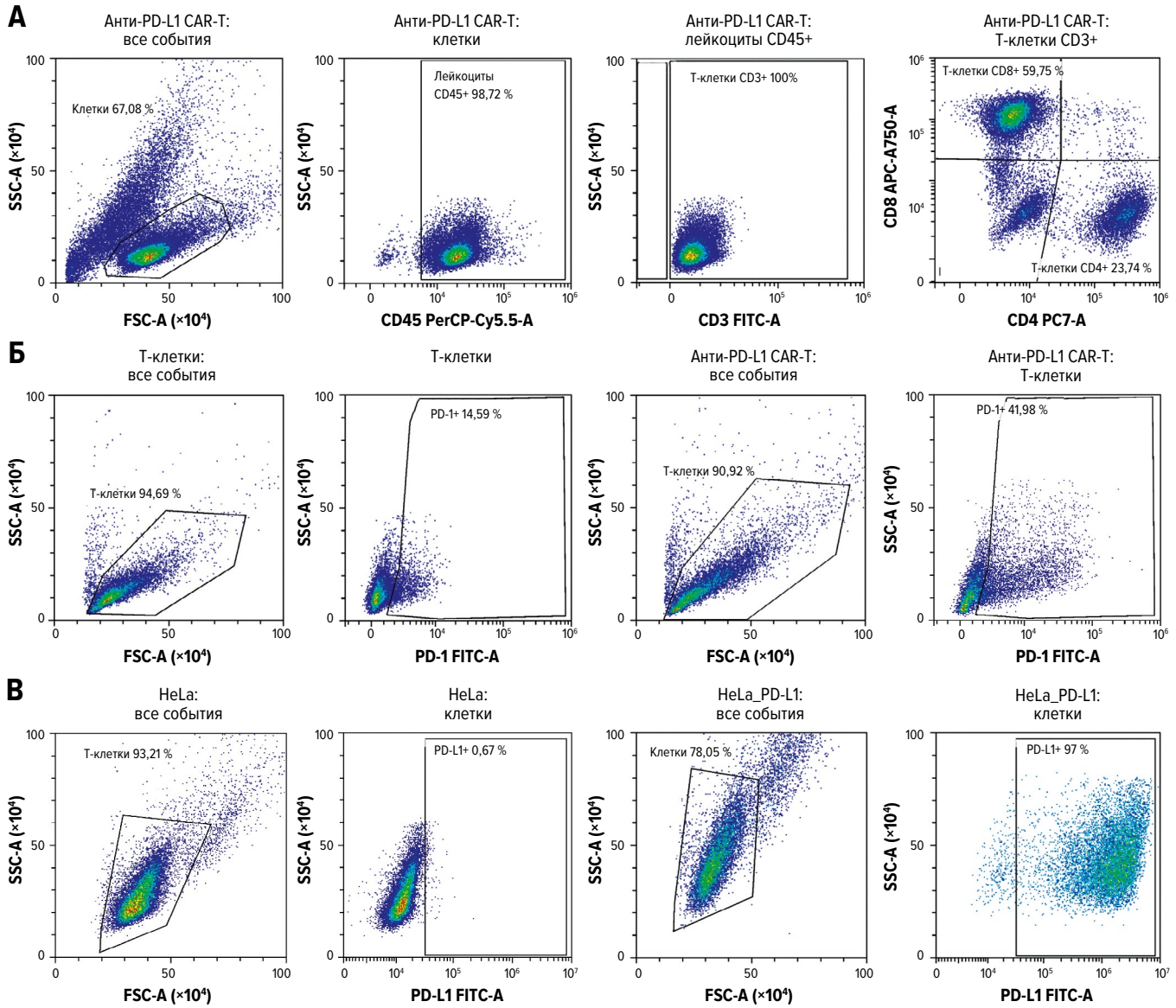

Рис. 5. Цитофлюориметрическая оценка исследуемых анти-PD-L1 CAR T-эффекторов и линии-мишени HeLa_PD-L1:
А — фенотипирование Т-клеточной популяции здорового донора по маркерам CD45, CD3, CD4, CD8; *Б* — оценка эффективности лентивирусной трансдукции анти-PD-L1 CAR-T; *В* — оценка экспрессии PD-L1 на поверхности цитоплазматической мембраны линии-мишени HeLa_PD-L1

Fig. 5. Cytofluorometric evaluation of the analyzed anti-PD-L1 CAR-T effectors and HeLa_PD-L1 target cell line:
A — phenotyping of healthy donor T-cell population by markers CD45, CD3, CD4, CD8; *Б* — assessment of anti-PD-L1 CAR-T lentiviral transduction efficiency; *B* — PD-L1 expression assessment on the surface of cytoplasmic membrane of HeLa_PD-L1 target cell line

тофлюориметрии клеточный супернатант был собран после 48 ч сокультивирования клеток-эффекторов с клетками-мишенями в соотношении E/T 1:20.

При сокультивировании исследуемых анти-PD-L1 CAR T-эффекторов с линией-мишенью HeLa_PD-L1 происходит значительное увеличение концентрации цитокинов IL-2 (1000 пг/мл), IL-6 (438,5 пг/мл), TNF-α (44 пг/мл), IFN-γ (1034 пг/мл), IL-10 (11,7 пг/мл) по сравнению с контрольной точкой без добавления CAR T-эффекторов. Индукция синтеза цитокинов — медиаторов воспаления в ходе сокультивирования с таргетной линией опухолевых клеток HeLa_PD-L1 указывает на специфичность подобранной конструкции химерного антигенного рецептора PD-1, а также подтверждает функциональность и наличие иммунного ответа исследуемых клеток-эффекторов на модели солидной опухоли.

Таким образом, презентация химерного антигенного рецептора PD-1 на поверхности цитоплазматической мембраны Т-лимфоцитов после лентивирусной трансдукции, специфичность цитотоксической активности эффекторов к лиганду PD-L1 свидетельствуют о функциональности полученной конструкции химерного рецептора. Это в равной степени подтверждается индукцией синтеза провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γ. Аппликации полученного CAR на основе молекулы ингибитора контрольных точек PD-1 могут в дальнейшем быть расширены относительно ликвидации иммуносупрессивного микроокружения опухолей различного генеза. Это, в свою очередь, может служить дополнительным эффективным инструментом в комплексном иммунотерапевтическом подходе.

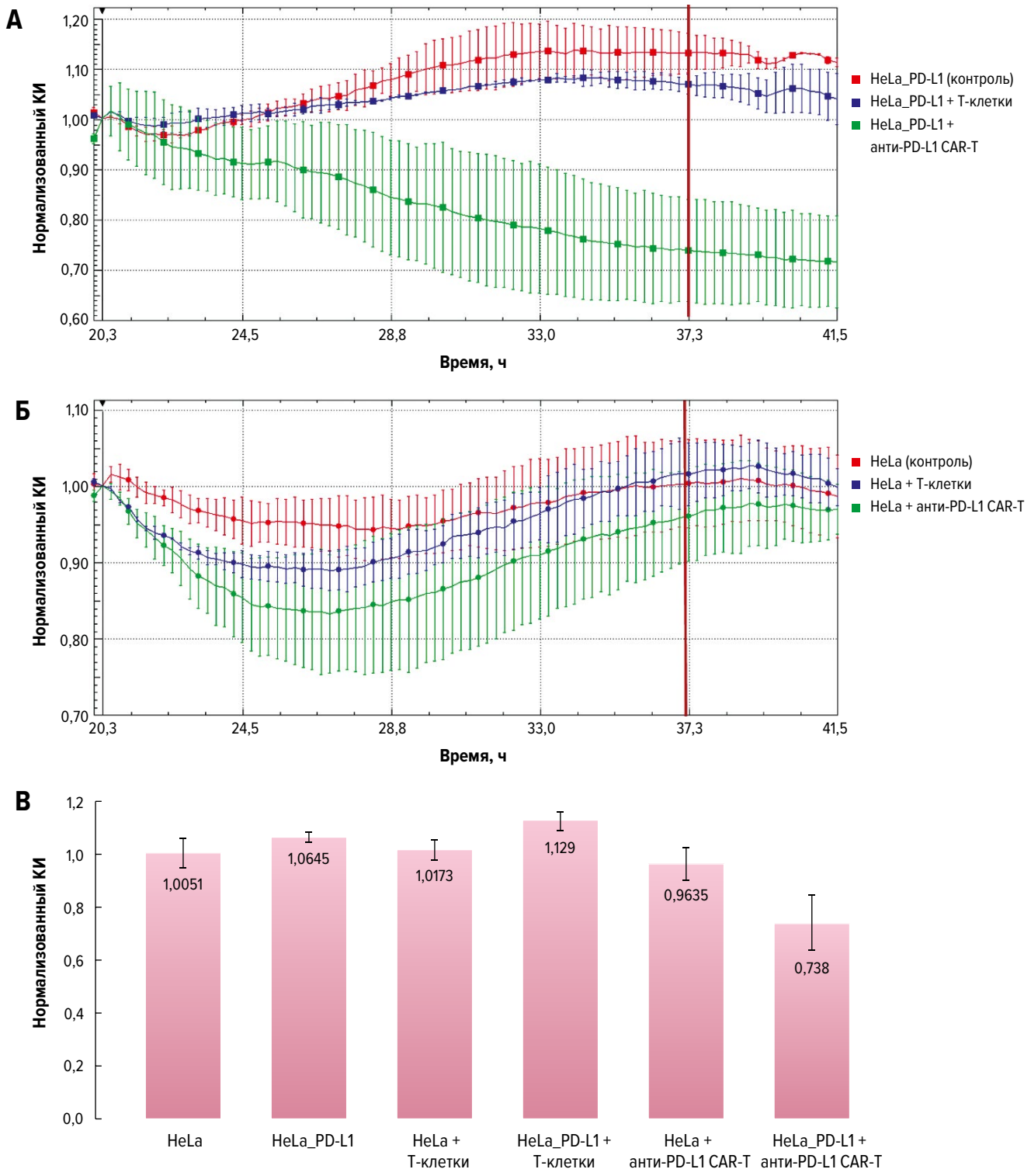

Рис. 6. Результаты анализа цитотоксической активности исследуемых анти-PD-L1 CAR Т-эффекторов на опухолевой линии-мишени HeLa в реальном времени с помощью системы xCelligence (RTCA). Соотношение E/T 1:20:

А — кривая клеточной пролиферации опухолевой линии-мишени HeLa_PD-L1 в ходе сокультивирования с Т-клетками (синий), анти-PD-L1 CAR Т-эффекторами (зеленый) и без сокультивирования (красный). Красной линией отмечена временна́я точка сравнения 37 ч; *Б* — кривая клеточной пролиферации контрольной опухолевой линии-мишени HeLa в ходе сокультивирования с Т-клетками (синий), клетками анти-PD-L1 CAR Т-эффекторами (зеленый) и без сокультивирования (красный). Красной линией отмечена временна́я точка сравнения 37 ч; *В* — гистограмма нормализованного клеточного индекса (КИ) контрольных точек и сокультивирования спустя 17 ч после добавления анти-PD-L1 CAR Т-эффекторов и Т-клеток донора для контроля неспецифической цитотоксической активности ($p < 0,05$)

Fig. 6. The real-time cytotoxicity assay of anti-PD-L1 CAR-T effectors on the HeLa tumor cell line using xCelligence (RTCA). E/T 1:20:

A — cell proliferation curve of HeLa_PD-L1 tumor cell line during T-cell (blue) and anti-PD-L1 CAR-T effectors (green) co-cultivation and without it (red). The red line marks the time reference point of 37 hours; *Б* — cell proliferation curve of control HeLa tumor cell line during T-cell (blue) and anti-PD-L1 CAR-T effectors (green) co-cultivation and without it (red). The red line marks the time reference point of 37 hours; *B* — histogram of normalized cell index (КИ) at the end points and with co-cultivation 17 hours after adding anti-PD-L1 CAR-T effectors and donor T-cells for the monitoring of non-specific cytotoxicity ($p < 0.05$)

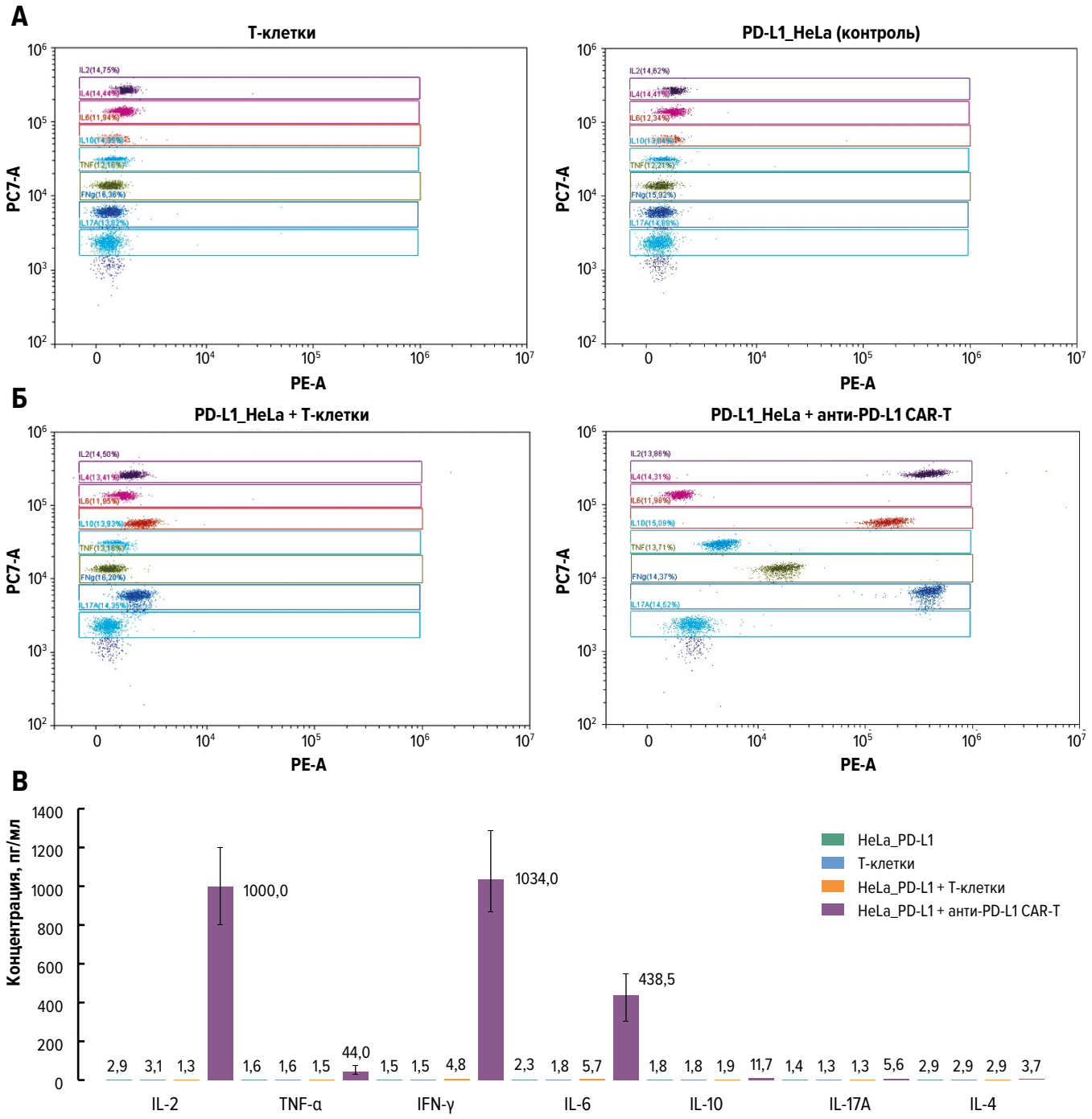

Рис. 7. Оценка содержания цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A после 48 ч сокультивирования анти-PD-L1 CAR T-эффекторов с клетками линии-мишени HeLa_PD-L1:

А — цитограммы уровня цитокинов в контрольных точках без сокультивирования: Т-клетки и клетки HeLa_PD-L1; *Б* — цитограммы уровня цитокинов в экспериментальных точках сокультивирования опухолевой линии-мишени HeLa_PD-L1 с эффекторами: Т-клетки и анти-PD-L1 CAR T-клетки; *В* — гистограмма количественной оценки содержания провоспалительных цитокинов при сокультивировании анти-PD-L1 CAR T-эффекторов с клетками линии-мишени HeLa_PD-L1

IFN-γ — интерферон-γ; IL — интерлейкин; TNF-α — фактор некроза опухолей-α.

Fig. 7. Levels of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A assessed 48 hours after anti-PD-L1 CAR-T effector co-cultivation with HeLa_PD-L1 target cell line:

A — cytograms of cytokine levels at the end points without co-cultivation: T-cells and HeLa_PD-L1 cells; *Б* — cytograms of cytokine levels at the experimental points of HeLa_PD-L1 tumor cell line co-cultivation with effectors: T-cells and anti-PD-L1 CAR-T cells; *B* — quantitative histogram showing the level of pro-inflammatory cytokines during anti-PD-L1 CAR-T effector co-cultivation with HeLa_PD-L1 target cell line

IFN-γ — interferon-gamma; IL — interleukin; TNF-α — tumor necrosis factor alpha.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая парадигма противоопухолевой терапии, в которой CAR T-клетки могут играть центральную роль, невозможна без понимания сложной организации опухоли и взаимодействия опухолевого микроокружения с Т-клетками, несущими химерный антигенный рецептор. До сих пор иммуносупрессивное влияние опухоли и микроокружения подавляли, в частности, с применением ИКТ. Новым этапом, напротив, стала

активация Т-лимфоцитов через такие молекулы, как CD28 или 4-1BB, которые критически необходимы для персистенции генетически модифицированных Т-лимфоцитов [32].

Одним из показательных примеров использования терапии, направленной как на опухоль, так и на опухолевое микроокружение с активацией CAR Т-лимфоцитов через молекулу 4-1BB, является исследование Q. Ma и соавт. [32]. Авторы продемонстрировали более высокий уровень анти-HER2 CAR Т-клеток с активирующим доменом CD28 в сравнении с анти-HER2 CAR Т-клетками с активирующим доменом 4-1BB при раке легкого, молочной железы, желудочно-кишечного тракта с метастазами и раке яичников с плевральным и перитонеальным выпотами. Однако секреция эффекторных цитокинов и пролиферация HER2.28ζ CAR Т-клеток значительно снижались в иммуносупрессивной среде плеврального или перитонеального выпота. В последующем эти авторы создали CAR Т-клетки с двойным нацеливанием (HER2.28ζ/PD-L1.BB), содержащие CSR, который переключал иммуносупрессивный сигнал от PD-L1 в активирующий молекулу 4-1BB. CRS-модифицированные CAR Т-клетки с двойным нацеливанием, в которых происходила активация молекулы 4-1BB, показали более высокую цитотоксичность и пролиферацию в сравнении с HER2.28ζ CAR-T [32].

Таким образом, комбинированная терапия, направленная как на опухоль, так и на опухолевое микроокружение, с применением нескольких препаратов различной природы может быть заменена новым поколением высокоэффективных CAR Т-продуктов с низкой частотой развития побочных эффектов.

Ожидается, что новое поколение CAR Т-клеточных продуктов в виде многокомпонентного препарата может иметь в составе несколько разнонаправленных CAR Т-эффекторов, что обеспечит одновременное воздействие как минимум в трех направлениях:

1) эрадикация опухолевых клеток, например, за счет взаимодействия химерного антигенного рецептора NKG2D с лигандами MICA/B, ULBP1–6 [38];
2) эрадикация иммуносупресирующих стареющих клеток, например, путем связывания химерного антигенного рецептора с CD87 [33];
3) активация CAR Т-клеток за счет PD-L1-экспрессирующего микроокружения, например, PD1–4-1BB-основанным химерным активирующим рецептором [32]. Так, специфичные анти-PD-L1 CAR Т-лимфоциты могут стать одним из ключевых элементов мультитаргетной CAR Т-клеточной терапии.

Нами получен и проверен на свою *in vitro* активность химерный антигенный рецептор против PD-L1. CAR Т-клетки, экспрессирующие данный рецептор, специфически распознают мишень, вызывают гибель опухолевых клеток, а также экспрессируют специфические цитокины IFN-γ, TNF-α и IL-2. Такой химерный антигенный рецептор можно модифицировать в активирующий (CSR) делецией CD3ζ-домена и использовать совместно с другими CAR без прогнозируемой неспецифической токсичности.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств гранта РНФ 19-75-10059.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.В. Петухов, А.А. Дакс.
Сбор и обработка данных: К.А. Левчук, П.А. Матейкович.
Предоставление материалов исследования: К.А. Левчук.
Анализ и интерпретация данных: А.В. Петухов, К.А. Левчук, А.А. Дакс.
Подготовка рукописи: А.В. Петухов, К.А. Левчук, Е.А. Столярова, А.Х. Валиуллина, А.А. Голдаева.
Окончательное одобрение рукописи: А.Х. Валиуллина, Е.А. Столярова, Э.Р. Булатов, Е.В. Байдюк, Н.А. Барлев, Я.Г. Торопова.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Cerrano M, Ruella M, Perales M-A, et al. The Advent of CAR T-Cell Therapy for Lymphoproliferative Neoplasms: Integrating Research Into Clinical Practice. Front Immunol. 2020;11:888. doi: 10.3389/fimmu.2020.00888.
2. Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. Immunol Rev. 2006;212(1):149–62. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00414.x.
3. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. Clin Cancer Res. 2006;12(20):6106–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
4. Park JR, DiGiusto DL, Slovak M, et al. Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor Re-directed Cytolytic T Lymphocyte Clones in Patients with Neuroblastoma. Mol Ther. 2007;15(4):825–33. doi: 10.1038/sj.mt.6300104.
5. Jafarzadeh L, Masoumi E, Fallah-Mehrjardi K, et al. Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy: Challenges and Ways Forward. Front Immunol. 2020;11:702. doi: 10.3389/fimmu.2020.00702.
6. Amini L, Silbert SK, Maude SL, et al. Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. Nat Rev Clin Oncol. 2022;19(5):342–55. doi: 10.1038/s41571-022-00607-3.
7. Mahadeo KM, Khazal SJ, Abdel-Azim H, et al. Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16(1):45–63. doi: 10.1038/s41571-018-0075-2.
8. Ren X, Guo S, Guan X, et al. Immunological Classification of Tumor Types and Advances in Precision Combination Immunotherapy. Front Immunol. 2022;13:790113. doi: 10.3389/fimmu.2022.790113.
9. Watanabe K, Kuramitsu S, Posey AD, June CH. Expanding the Therapeutic Window for CAR T Cell Therapy in Solid Tumors: The Knowns and Unknowns of CAR T Cell Biology. Front Immunol. 2018;9:2486. doi: 10.3389/fimmu.2018.02486.
10. Bent EH, Millan-Barea LR, Zhuang I, et al. Microenvironmental IL-6 inhibits anti-cancer immune responses generated by cytotoxic chemotherapy. Nat Commun. 2021;12(1):6218. doi: 10.1038/s41467-021-26407-4.
11. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF-α and IFN-γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. Cell. 2021;184(1):149–168.e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.025.
12. Patel SJ, Sanjana NE, Kishton RJ, et al. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. Nature. 2017;548(7669):537–42. doi: 10.1038/nature23477.
13. Kearney CJ, Vervoort SJ, Hogg SJ, et al. Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. Sci Immunol. 2018;3(23):eaar3451. doi: 10.1126/sciimmunol.aar3451.
14. Han P, Dai Q, Fan L, et al. Genome-Wide CRISPR Screening Identifies JAK1 Deficiency as a Mechanism of T-Cell Resistance. Front Immunol. 2019;10:251. doi: 10.3389/fimmu.2019.00251.

15. Larson RC, Kann MC, Bailey SR, et al. CAR T cell killing requires the IFNγR pathway in solid but not liquid tumours. Nature. 2022;604(7906):563–70. doi: 10.1038/s41586-022-04585-5.

16. Mimura K, Teh JL, Okayama H, et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. Cancer Sci. 2018;109(1):43–53. doi: 10.1111/cas.13424.

17. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. J Immunother Cancer. 2019;7(1):305. doi: 10.1186/s40425-019-0770-2.

18. Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей. Онкопедиатрия. 2017;4(1):49–55. doi: 10.15690/onco.v4i1.1684.

[Klyuchagina YI, Sokolova ZA, Baryshnikova MA. Role of PD-1 receptor and its ligands PD-L1 and PD-L2 in cancer immunotherapy. Oncopediatrics. 2017;4(1):49–55. doi: 10.15690/onco.v4i1.1684. (In Russ)]

19. Liu J, Chen Z, Li Y, et al. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. Front Pharmacol. 2021;12:731798. doi: 10.3389/fphar.2021.731798.

20. Zhulai G, Oleinik E. Targeting regulatory T cells in anti-PD-1/PD-L1 cancer immunotherapy. Scand J Immunol. 2022;95(3):e13129. doi: 10.1111/sji.13129.

21. Wu M, Huang Q, Xie Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. J Hematol Oncol. 2022;15(1):24. doi: 10.1186/s13045-022-01242-2.

22. Jia Q, Wang A, Yuan Y, et al. Heterogeneity of the tumor immune microenvironment and its clinical relevance. Exp Hematol Oncol. 2022;11(1):24. doi: 10.1186/s40164-022-00277-y.

23. Zhao Y, Liu L, Weng L. Comparisons of Underlying Mechanisms, Clinical Efficacy and Safety Between Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Immunotherapy: The State-of-the-Art Review and Future Perspectives. Front Pharmacol. 2021;12:714483. doi: 10.3389/fphar.2021.714483.

24. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. Nat Rev Drug Discov. 2015;14(9):642–62. doi: 10.1038/nrd4663.

25. Liu Y-T, Sun Z-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. Theranostics. 2021;11(11):5365–86. doi: 10.7150/thno.58390.

26. Rao SG, Jackson JG. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! Trends in Cancer. 2016;2(11):676–87. doi: 10.1016/j.trecan.2016.10.001.

27. Schmitt CA, Wang B, Demaria M. Senescence and cancer – role and therapeutic opportunities. Nat Rev Clin Oncol. 2022;19(10):619–36. doi: 10.1038/s41571-022-00668-4.

28. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? Trends in Cancer. 2020;6(10):838–57. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.004.

29. Chen C, Gu Y-M, Zhang F, et al. Construction of PD1/CD28 chimeric-switch receptor enhances anti-tumor ability of c-Met CAR-T in gastric cancer. Oncoimmunology. 2021;10(1):1901434. doi: 10.1080/2162402X.2021.1901434.

30. Biopharma dealmakers. Using immunology to bring new paradigms to oncology therapies (Internet). Available from: https://www.nature.com/articles/d43747-020-00780-3 (accessed 29.032023).

31. Liu H, Lei W, Zhang C, et al. A phase I trial using CD19 CAR-T expressing PD-1/CD28 chimeric switch-receptor for refractory or relapsed B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2019;37(15_suppl):7557. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7557.

32. Ma Q, He X, Zhang B, et al. A PD-L1-targeting chimeric switch receptor enhances efficacy of CAR-T cell for pleural and peritoneal metastasis. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):380. doi: 10.1038/s41392-022-01198-2.

33. Неклесова М.В., Смирнов С.В., Шатилова А.А. и др. Получение специфичных к антигену CD87 CAR Т-лимфоцитов и оценка их функциональной активности in vitro. Клиническая онкогематология. 2022;15(4):340–8. doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-340-348.

[Neklesova MV, Smirnov SV, Shatilova AA, et al. Production of CD87 Antigen-Specific CAR-T Lymphocytes and Assessment of Their In Vitro Functional Activity. Clinical oncohematology. 2022;15(4):340–8. doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-340-348. (In Russ)]

34. Зайкова Е.К., Левчук К.А., Поздняков Д.Ю. и др. Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях. Клиническая онкогематология. 2020;13(3):295–306. doi: 10.21320/2500-2139-2020-13-3-295-306.

[Zaikova EK, Levchuk KA, Pozdnyakov DYu, et al. Efficient Transduction of T-Lymphocytes by Lentiviral Particles in Oncoimmunological Studies. Clinical oncohematology. 2020;13(3):295–306. doi: 10.21320/2500-2139-2020-13-3-295-306. (In Russ)]

35. Zak KM, Kitel R, Przetocka S, et al. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. Structure. 2015;23(12):2341–8. doi: 10.1016/j.str.2015.09.010.

36. Tan S, Zhang H, Chai Y, et al. An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. Nat Commun. 2017;8(1):14369. doi: 10.1038/ncomms14369.

37. Na Z, Yeo SP, Bharath SR, et al. Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. Cell Res. 2017;27(1):147–50. doi: 10.1038/cr.2016.77.

38. Левчук К.А., Осипова С.А., Онопченко А.В. и др. Экспериментальное исследование функциональной активности химерного антигенного рецептора NKG2D in vitro и in vivo. Клиническая онкогематология. 2022;15(4):327–39. doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-327-339.

[Levchuk KA, Osipova SA, Onopchenko AV, et al. Experimental Study of the In Vitro and In Vivo Functional Activity of NKG2D Chimeric Antigen Receptor. Clinical oncohematology. 2022;15(4):327–39. doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-327-339. (In Russ)]