© Терещенко В.П., Сенников С.В., 2021

Терещенко В.П., Сенников С.В.

Опухолевые ксенотрансплантаты как модель для доклинических испытаний генетически модифицированных клеточных препаратов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 630099, г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме

В настоящее время активно развиваются методы персонализированной иммунотерапии различных злокачественных новообразований, основанные на адоптивном переносе генетически модифицированных клеточных препаратов дендритных клеток, макрофагов, НК-клеток, НКТ-клеток и Т-лимфоцитов, что все больше актуализирует опухолевые ксенотрансплантаты как модель для доклинических испытаний эффективности данных клеточных продуктов. Модель опухолевых ксенотрансплантатов наиболее полно из существующих методов имитирует естественный опухолевый рост, поскольку воспроизводит трехмерную васкуляризованную опухоль в организме с поддерживающимся гомеостазом, метаболизмом и возможными механизмами толерантности к терапевтическому агенту. Длительное использование модели привело к ее стандартизации за счет появления хорошо охарактеризованных опухолевых клеточных линий человека и линий иммунодефицитных мышей, а также методов визуализации *in vivo*, позволяющих достаточно объективно оценивать прогрессию новообразования. Современные подходы к трансплантации первичных опухолей, полученных от пациентов, позволяют более полно имитировать внутри- и межопухолевую гетерогенность, наблюдаемую в клинической практике, что обеспечивает более адекватную оценку противоопухолевого потенциала исследуемых клеточных препаратов. На данный момент в мировой литературе накоплен большой объем данных о свойствах используемых опухолевых линий и линий инбредных мышей и методологии модели, который необходим для получения достоверных результатов в модели опухолевых ксенотрансплантатов. Достаточно подробно изучены биология развития опухолевого процесса после ксенотрансплантации опухолевых клеток человека в организм мыши и механизмы взаимодействия терапевтических генетически модифицированных Т-клеток с полученной опухолью, что также будет рассмотрено в данной работе для помощи в выборе адекватной и информативной модели для исследования.

Ключевые слова: опухолевые ксенотрансплантаты; опухолевые клеточные линии; линии иммунодефицитных мышей; генетически модифицированные Т-лимфоциты

Статья получена 15.06.2021. Принята в печать 27.10.2021.

Для цитирования: Терещенко В.П., Сенников С.В. Опухолевые ксенотрансплантаты как модель для доклинических испытаний генетически модифицированных клеточных препаратов. Иммунология. 2021; 42 (6): 730–741. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-730-741>

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта РНФ № 21-65-00004, <https://rscf.ru/project/21-65-00004/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Сенников Сергей Витальевич –
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
молекулярной иммунологии
ФГБНУ НИИФКИ
Минобрнауки России,
Новосибирск,
Российская Федерация
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Tereshchenko V.P., Sennikov S.V.

Tumor xenografts as the model for a preclinical trials of genetically modified cell therapy

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 630099, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Currently, anticancer therapy based on the adoptive transfer of genetically modified cells is being actively developed, which increasingly actualizes tumor xenografts as a model for preclinical testing of these cellular products. The tumor xenografts model is the closest of the existing methods that simulate natural tumor growth since it reproduces a three-dimensional vascularized tumor in the body with maintained homeostasis, metabolism, and possible mechanisms of tolerance to the therapeutic agent. Long-term use of the model has led to its standardization due to the emergence of well-characterized tumor cell lines and inbred mice, as well as *in vivo* imaging methods that measure the progression of cancer objectively. Modern approaches based on patient-derived tumor xenografts more closely imitate the intratumoral and intertumoral heterogeneity observed in clinical practice, which provides a more adequate assessment of the antitumor potential of the cell products studied. At the moment, the world literature has accumulated a large amount of data on the used tumor cell lines and inbred mice properties and the model methodology, which is necessary to obtain reliable results in the tumor xenograft model. The xenograft tumor biology and the interaction mechanisms of therapeutic genetically modified T cells and the tumor have been studied in sufficient detail, which will also be considered in this work to help in choosing an adequate and informative model for research.

Keywords: tumor xenografts; tumor cell lines; immunodeficient mice; genetically modified T-lymphocytes

Received 15.06.2021. **Accepted** 27.10.2021.

Funding. The research was supported by the grant of the RSF no. 21-65-00004, <https://rscf.ru/project/21-65-00004/>.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For citation: Tereshchenko V.P., Sennikov S.V. Tumor xenografts as the model for a preclinical trials of genetically modified cell therapy. *Immunologiya*. 2021; 42 (6): 730–741. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-730-741> (in Russian)

For correspondence

Sergey V. Sennikov –
MD, PhD, Professor,
Head of Molecular
Immunology Laboratory,
RIFCI of the MSHE of Russia,
Novosibirsk,
Russian Federation
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Введение

В настоящее время активно развиваются методы терапии различных злокачественных новообразований, основанные на адоптивном переносе генетически модифицированных клеточных препаратов дендритных клеток, макрофагов, НК-клеток, НКТ-клеток и Т-лимфоцитов. Наиболее широкое распространение получили подходы, осуществляющие создание и перенос генетически модифицированных Т-лимфоцитов: 1) CAR-T-клеток с химерным антигенным рецептором, специфичным к опухоль-ассоциированному антигену; 2) Т-лимфоцитов с трансгенным TCR (TCR-T-клетки), специфичным к необходимому эпитопу опухоль-ассоциированного антигена в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС) и 3) TCR-подобных CAR-T клеток с химерным антигенным рецептором, специфичным к комплексу молекулы МНС и эпитопа опухоль-ассоциированного антигена.

В связи с отличиями между описанными видами генетически модифицированных Т-клеток в механизмах реализации эффекторных функций, а также в связи с объективно сложной картиной взаимодействия опухоли и клеток иммунной системы все перечисленные клеточные препараты требуют тщательного изучения безопасности и эффективности на этапе доклинических исследований, т. е. до первого введения препарата человеку. На данный момент для доклинического исследования описанных Т-клеточных препаратов наиболее часто применяются модели ксенотрансплантации мышам че-

ловеческих опухолевых клеточных линий. Как и любая другая, модель опухолевых ксенотрансплантатов требует стандартизации и выбора подходящих материалов и модельного организма, а также условий проведения и измерения. Для модели опухолевых ксенотрансплантатов среди параметров, требующих подбора, можно выделить: опухолевую клеточную линию, несущую необходимый антиген, а также необходимый гаплотип МНС (HLA), что особенно важно в случае изучения Т-клеток, распознающих эпитопы антигена в комплексе с молекулой МНС; линию мышей-реципиентов, которая часто является иммунодефицитной, для снижения реакции отторжения клеток человека у мыши; способ введения (ортотопический, эктопический или системный), обеспечивающий различные условия роста и распространенность опухолевых клеток в организме, обуславливающий способ измерения роста и развития опухоли. Также для выбора наиболее подходящей модели зачастую требуется четкое понимание биологии роста и развития опухоли, более того, механизмов ее взаимодействия с иммунными клетками.

Модель опухолевых ксенотрансплантатов приобретает все большую актуальность в связи с активным развитием методов клеточной иммунотерапии и технологий генетической модификации клеточных препаратов для борьбы с онкологическими заболеваниями. Поэтому в данном обзоре мы постараемся осветить используемые в современной лабораторной практике варианты модели опухолевых ксенотрансплантатов с указанием используемых клеточных линий, линий мышей-реципи-

ентов, методик исполнения и исследуемых клеточных препаратов. Также будут рассмотрены биология развития опухолевого процесса после ксенотрансплантации опухолевых клеток человека в организм мыши и механизмы взаимодействия терапевтических генетически модифицированных Т-клеток с полученной опухолью, что, возможно, поможет выбрать адекватную и информативную модель для исследования.

Биология ксенотрансплантированных опухолей

В модели опухолевых ксенотрансплантатов раковые клетки или раковые клеточные линии человека трансплантируют иммунодефицитным мышам. Далее проводят противоопухолевую терапию. Главным результатом исследования на модели являются данные измерения роста и размера опухоли при проведении терапии в сравнении с контролем без проводимого лечения.

Рост новообразований связан с широким спектром биологических процессов, включающих регуляцию пролиферации и контроль клеточного цикла, взаимодействие со стромой ткани, ангиогенез и ускользание от иммунного ответа. Успешное протекание данных процессов приводит к макроскопическому увеличению объема опухоли. Типично размер опухолевого ксенотрансплантата, введенного местно, увеличивается со 100 мм³ (диаметр 6 мм) до 1000 мм³ (диаметр 12 мм) за несколько недель [1]. Время удвоения ксенотрансплантированных опухолевых клеток *in vivo* существенно превосходит время удвоения тех же клеток в условиях *in vitro* и варьирует от 39 до 100 ч [2]. Также по мере увеличения объема опухоли *in vivo* увеличивается время удвоения ее клеток, т. е. снижается темп ее роста. Поэтому наиболее точными математическими моделями, описывающими рост опухоли *in vivo*, считают модель Гомпертца (Gompertz), учитывающую экспоненциальный рост числа опухолевых клеток и экспоненциальное увеличение времени их удвоения, и экспоненциально-линейную модель, разделяющую рост опухоли на 2 фазы: экспоненциальную и линейную [3]. Математические модели опухолевого роста могут применяться для тестирования новых гипотез роста и для определения их предсказательной силы в сравнении с экспериментальными данными, для вычисления прошлых (вплоть до возникновения первой опухолевой клетки) и будущих темпов роста опухолей [4], а также определения противоопухолевой активности исследуемого терапевтического агента в ксенотрансплантатной модели [5]. Применение различных моделей опухолевого роста к экспериментальным данным можно увидеть в работе S. Benzekry и соавт. [3].

Злокачественные опухоли обладают разнородным клеточным составом и представляют собой связанную внеклеточным матриксом массу делящихся, дифференцированных и погибающих опухолевых клеток, стромальных клеток, сосудов и целого набора иммунных клеток с различными функциями. Внеклеточный матрикс опухоли плохо структурирован и состоит из перекрестносшитых белков (в основном коллагена, эластина)

и протеогликанов (в основном гиалуроновой кислоты). Конкретные структура и состав внеклеточного матрикса ксенотрансплантированной опухоли зависят от вида используемой клеточной линии и влияют на диффузию и эффект терапевтического агента внутри опухоли [6]. Такие специфичные состав и структура опухоли получили название «матрисом» (matrisome) и были описаны для некоторых типов ксенотрансплантированных опухолей [7]. Количество внеклеточного матрикса в опухоли варьирует от 20 до 90 % [8]. Ксенотрансплантированные опухоли, как правило, обладают меньшим количеством стромы по сравнению с первичными [9]. Основную клеточную массу стромы ксенотрансплантированных опухолей составляют фибробласты и эндотелиальные клетки (до 10–80 % от общего числа клеток опухоли) [10]. Опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer associated fibroblasts, CAFs) участвуют в формировании и ремоделировании внеклеточного матрикса, а также поддерживают рост, инвазию и ангиогенез опухоли путем межклеточного взаимодействия и секреции гуморальных факторов [11].

При достижении ксенотрансплантированной опухолью объема 1–2 мм³ начинается ее васкуляризация мелкими капиллярами для доставки кислорода и питательных веществ. Механизмами васкуляризации опухоли могут быть прорастание существующих сосудов из окружающих тканей и внутриопухолевый неоваскуляризация путем привлечения предшественников эндотелиоцитов, васкулогенной мимикрии и инвагинального васкулогенеза [12]. Сосудистая сеть опухоли плохо структурирована, содержит шунты и атипично широкие сосуды, что может приводить к центральному или диффузному некрозу опухоли и сдерживать ее рост [13]. Концентрация питательных веществ и кислорода снижается в направлении от капилляра и может соответствовать уровням от наблюдающихся в артериальной крови до 0 [14]. В связи с критически важным значением доставки питательных веществ и кислорода для опухолевого роста капилляр с цилиндрическим фрагментом опухоли вокруг него может рассматриваться как структурная единица опухолевой ткани, так называемая опухолевая хорда (tumor cord). Типичный размер капилляра опухолевой хорды составляет 0,2–0,5 мм, а радиус цилиндра опухолевой ткани – 50–100 мкм [13].

В результате применения современных методов ДНК- и РНК-секвенирования на данный момент строго определено, что опухолевые клетки даже внутри одного отдельно взятого злокачественного новообразования генетически и эпигенетически гетерогенны. При этом генетически отличные опухолевые субклоны появляются путем разветвляющегося мутагенеза и накапливают различные драйверные мутации, обеспечивающие фенотипическую и функциональную гетерогенность опухоли [15]. Выявленная эпигенетическая (модификации гистонов, метилирование ДНК, профили экспрессии различных видов РНК) гетерогенность опухолевых клеток, в свою очередь, считается причиной иерархической тканеподобной организованности опухолей, в которой

Рис. 1. Факторы, определяющие гетерогенность опухолей

раковые стволовые клетки ответственны за самоподдержание и рост новообразования [16]. Также результаты недавних исследований говорят о влиянии пространственно-временных факторов на функционирование опухолевых клеток. Так, опухолевые клетки, располагающиеся на поверхности опухоли, формируют крупные клоны, обладают фенотипом раковых стволовых клеток и обеспечивают рост опухоли. При нарастании новых поверхностных слоев опухоли данные клетки уходят вглубь, а функция увеличения клеточного числа остается за новосформированными поверхностными опухолевыми клетками [17, 18]. Таким образом, гетерогенность опухоли определяется набором генетических, эпигенетических и пространственно-временных факторов и влияет на скорость ее прогрессии и чувствительность к терапевтическим агентам (рис. 1).

Известно, что опухолевые ксенотрансплантаты, полученные при введении клеточных линий, обладают менее гетерогенным составом опухолевых клеток по сравнению ксенотрансплантатами, полученными из первичных опухолевых клеток пациентов, и естественными злокачественными образованиями. Это связывают с потерей гетерогенности при длительном культуральном отборе опухолевых клеточных линий, способных к самовоспроизведению *in vitro*, и считают причиной сниженной клинической эффективности противоопухолевых препаратов, тестируемых на таких моделях [19]. Однако для опухолевых ксенотрансплантатов, полученных при введении клеточных линий, все же показаны схожая с естественными злокачественными новообразованиями пространственно-временная клональная организация [18] и гетерогенность по соотношению пролиферирующих и дифференцированных клеток и клеток, обладающих обоими свойствами [20], по распределению опухолевых клеток, несущих иммуносупрессивные молекулы контрольных точек [21], по некротическим изменениям внутри опухоли и даже по

репортерному гену, введенному в опухолевую линию перед переносом в животное, что говорит о продолжающемся в условиях *in vivo* накоплении генетических и эпигенетических изменений среди линейных опухолевых клеток [22].

Механизмы взаимодействия опухоли и генетически модифицированных Т-лимфоцитов

CAR-T-клетки распознают опухолевые клетки путем связывания CAR-рецептора с поверхностным опухолево-ассоциированным антигеном, поэтому наиболее перспективные результаты получены для CAR-T-клеточной терапии, направленной на антиген CD19, присутствующий как на здоровых В-клетках, так и на клетках В-клеточных лимфом [23]. Сниженную эффективность CAR-T-клеток против солидных опухолей связывают с недостатком специфичных поверхностных опухолево-ассоциированных антигенов и, следовательно, со сложностью привлечения CAR-T-клеток непосредственно в опухолевый очаг. Генетически модифицированные TCR-T-клетки распознают опухолевые клетки по комплексам молекул МНС с эпитопами внутриклеточных опухолево-ассоциированных антигенов, что открывает широкий выбор доступных мишеней, среди которых неоантигены, продукты онкогенов и онкогенных вирусов, а также раково-тестикулярные антигены, и делает TCR-T-клетки перспективным препаратом для терапии солидных опухолей. TCR-подобные CAR-T-клетки с химерным антигенным рецептором, антиген-распознающий домен которого представлен scFv-фрагментом TCR-подобного антитела, специфичного к комплексу желаемого эпитопа и молекулы МНС, а внутриклеточный сигнальный домен может повторять таковой для CAR-T-клеток, распознают опухолевые клетки по комплексам молекул МНС и эпитопа, но функция этих клеток может модулироваться с помощью моди-

Рис. 2. Схематическое изображение рецепторов генетически модифицированных Т-лимфоцитов и их молекул-мишеней

MHC I – молекула главного комплекса гистосовместимости класса I и ее субъединицы $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - и $\beta 2$ -микроглобулин; *scFv* – варибельный фрагмент единичной цепи антитела (тяжелой и легкой цепи); *TCR* – Т-клеточный рецептор и его субъединицы α -, β -, γ -, δ -, ϵ ; *ITAM* – активационный мотив иммунорецепторов.

фикации внутриклеточного сигнального домена CAR-рецептора. Схематичное строение 3 описанных видов трансгенных рецепторов и их мишеней представлены на рис. 2.

После распознавания целевого антигена или эпитопа в комплексе с MHC эффекторные генетически модифицированные Т-лимфоциты формируют иммунный синапс с опухолевой клеткой-мишенью. TCR-T-клетки формируют классический иммунный синапс, характеризующийся наличием центрального, периферического и дистального супрамолекулярного активационного кластера (Central supramolecular activating cluster, SMAC), относительно длительным временем существования и относительно низкой интенсивностью проводимого сигнала [24]. При реализации эффекторной функции CAR-T-клетки формируют неклассический иммунный синапс, характеризующийся разрозненной микрокластеризацией Lck-киназ в центральном SMAC, меньшей площадью, отсутствием кольца адгезии из молекул LFA-1 и меньшим временем существования, но более быстрым проведением сигнала и более ранней доставкой литических гранул в синаптическую щель по сравнению с классическим иммунным синапсом, сформированным при участии молекул TCR [24]. Свойства иммунного синапса, формируемого TCR-подобными Т-клетками, на данный момент не изучены, однако можно предположить, что они объединяют в себе свойства синапсов CAR- и TCR-T-клеток, поскольку при формировании такого синапса будут участвовать молекулы MHC, как и в случае TCR-T-клеток, а сигнал будет проводиться через сигнальный внутриклеточный домен CAR-T-клеток.

Несмотря на отличия в механизмах распознавания антигена и проведения сигнала основным цитотоксическим механизмом генетически модифицированных $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов, как и естественных лимфоцитов человека, является перфорин-гранзим-зависимый лизис. Так, блокирование FasL практически не влияет, а ингибирование секреции перфорина хелатором Ca^{2+} существенно снижает цитотоксический эффект генетически модифицированных Т-клеток [25]. При этом $CD4^+$ -Т-клетки несут меньшее количество перфорина и гранзима по сравнению с $CD8^+$ -Т-клетками, что приводит к задержке в реализации цитотоксической функции и необходимости большего количества эффекторных клеток для достижения сопоставимого цитолиза [26]. Однако отсутствие $CD4^+$ -Т-клеток в генетически модифицированном клеточном препарате может приводить к дисфункции и апоптозу $CD8^+$ -клеток, а их наличие увеличивает эффективность противоопухолевой терапии [27]. В случае нарушенной дегрануляции существование иммунного синапса продлевается и цитотоксичность реализуется при поддержке относительно медленного Fas/FasL-опосредованного механизма [28]. Также было показано, что CAR- и TCR-T-клетки способны осуществлять последовательный серийный лизис множества опухолевых клеток [29] и одновременный лизис нескольких клеток-мишеней [26]. При этом, несмотря на различное время существования иммунного синапса CAR- и TCR-T-клеток, кинетика последовательного распознавания мишеней и их лизиса, а следовательно, общий уровень цитотоксичности CAR- и TCR-T-клеток совпадают [29].

Все 3 вида генетически модифицированных Т-клеток подвержены клеточному старению и истощению под влиянием опухолевого микроокружения. В связи с неадекватной васкуляризацией метаболически опухолевое микроокружение характеризуется сниженными концентрациями кислорода и глюкозы. В условиях гипоксии эффекторные клетки переключаются с оксидативного фосфорилирования на гликолиз, однако низкие концентрации глюкозы в опухолевом микроокружении препятствуют эффективному протеканию данного процесса, что приводит к дисфункции Т-клеток [30]. Также функционированию эффекторных клеток в опухолевом микроокружении препятствуют повышенные концентрации аденозина, поглощение аргинина опухоль-ассоциированными макрофагами, дефицит глутамина и триптофана [30]. Иммунологически микроокружение солидных опухолей характеризуется экспрессией иммуносупрессивных молекул ПГЕ2, ТФР β , ИЛ-10, NO, IDO, ИЛ-4, ROS-опухолевыми клетками, миелоидными клетками-супрессорами, опухоль-ассоциированными макрофагами, фибробластами и Treg, препятствующими активации и пролиферации эффекторных генетически модифицированных Т-клеток [31]. Также, помимо гуморальных факторов, в опухолевом микроокружении экспрессируются иммуносупрессивные молекулы контрольных точек PD-L1/2, TIM-3, приводящие к формированию истощенного фенотипа эффекторных Т-клеток [32]. Экспрессия опухолевыми клетками и клетками опухолевого микроокружения иммуносупрессивных молекул является одним из механизмов ускользания опухоли от иммунного ответа, в том числе от терапевтического действия генетически модифицированных Т-лимфоцитов.

Опухолевые линии, используемые в модели ксенотрансплантатов

Основным требованием к опухолевой клеточной линии, используемой для создания модели ксенотрансплантативной опухоли с целью доклинического исследования эффективности препаратов генетически модифицированных Т-лимфоцитов, является экспрессия антигенов-мишеней, на которые направлены изучаемые генетически модифицированные Т-лимфоциты. На данный момент на основе данных об уровнях экспрессии в опухолевых и здоровых тканях, а также на основе данных об эффективности экспериментальной терапии сформировался перечень поверхностных и внутриклеточных антигенов, считающихся перспективными мишенями для CAR- и TCR-Т-клеточной терапии соответственно (табл. 1). Согласно механизму распознавания антигены-мишени для TCR-подобных CAR-Т-клеток совпадают с мишенями для TCR-Т-клеток.

Для создания ксенотрансплантативных опухолей наиболее широкое применение получили опухолевые линии из панели NCI60, состоящей из 60 наиболее хорошо охарактеризованных опухолевых клеточных линий человека [1]. Однако, как видно из табл. 1, лишь немногие клеточные линии панели NCI60 экспрессируют

опухоль-ассоциированные антигены, считающиеся сейчас перспективными мишенями для современной клеточной терапии генетически модифицированными Т-клетками, что может быть связано с потерей фенотипических и морфологических свойств первичных опухолевых клеток, а также с накоплением мутаций, хромосомных перестроек и даже изменений кариотипа в связи с длительными периодами культивирования *in vitro* в нефизиологичных условиях [34]. С целью максимального имитирования гетерогенности и структуры опухолей, наблюдающихся в клинической практике, для трансплантации мышам могут использоваться первичные резецированные опухоли человека (Patient derived xenograft, PDX) [35], однако такой опухолевый материал менее удобен в получении и поддержании по сравнению с опухолевыми клеточными линиями.

Некоторые опухолевые линии, в том числе не входящие в панель NCI60, экспрессирующие перспективные антигены-мишени для генетически модифицированных Т-клеток, представлены в табл. 1. Однако экспрессия антигенов может варьировать в различных образцах одной опухолевой линии и опухолевой ткани от разных пациентов, что делает необходимой экспериментальную проверку экспрессии антигена-мишени в опухолевом материале перед началом исследований [36].

Опухолевая линия, несущая необходимый антиген-мишень, может быть использована для изучения цитотоксичности экспериментального Т-клеточного препарата *in vitro* и для создания опухолевых ксенотрансплантатов *in vivo* [37]. В качестве контролей в *in vitro* и *in vivo* экспериментах по изучению эффективности Т-клеточных препаратов используют опухолевую линию, не экспрессирующую необходимый антиген-мишень, а также, в случае изучения TCR-Т-клеток и TCR-подобных Т-клеток, опухолевую линию, обладающую нерелевантным HLA-гаплотипом, поскольку их действие HLA-рестриктировано [38]. Если опухолевая линия не экспрессирует необходимый антиген-мишень или обладает неподходящим MHC-гаплотипом, применяется трансдукция клеточной линии необходимым антигеном или желаемым HLA-аллелем [39].

Линии мышей, используемые в качестве реципиентов опухолевых ксенотрансплантатов

В качестве реципиентов опухолевых ксенотрансплантатов принято использовать иммунодефицитных мышей, что увеличивает шанс успешного развития опухоли, а также позволяет более достоверно оценить эффект изучаемого терапевтического продукта в связи со сниженной реактивностью иммунной системы мыши. Так, вероятность успешной трансплантации опухоли мышам nude (*nu/nu*), несущим мутацию в гене *Foxn1* в 17-й хромосоме и характеризующимся нарушением развития железистого эпителия, отсутствием шерсти, тимуса и, соответственно, малым количеством функциональных Т-лимфоцитов, составляет более 75 % [35]. Успешная трансплантация ксенотрансплантата опухолевого материала мышам линий SCID и NOD/SCID, несущим

Таблица 1. Возможные поверхностные и внутриклеточные антигены-мишени для генетически модифицированных Т-клеток и их экспрессия в опухолевых линиях и первичных злокачественных новообразованиях

Расположение антигена	Антиген [31; 33]	Экспрессия в злокачественных новообразованиях	Экспрессирующая опухолевая линия
Поверхностное	CEA (CEACAM5) – раково-эмбриональный антиген	Колоректальная карцинома, рак молочной железы (РМЖ), метастазы в печени и др.	Аденокарцинома толстой кишки – MC38/CEA Аденокарцинома желудка – OE19
	ErCAM – молекула адгезии эпителиальных клеток	Рак желудка, карциномы толстой кишки, печеночно-клеточная карцинома, карцинома поджелудочной железы, рак предстательной железы, карцинома пищевода	Рак яичников – SKOV3 Колоректальный рак – SW620, SW480, HCT116 LoVo, HT-29, CACO-2 Плоскоклеточная карцинома – A-431 Аденокарцинома поджелудочной железы – CAPAN-2 Рак пищевода – OE19
	HER2 – второй рецептор эпидермального фактора роста	Глиобластомы, глиомы, саркомы, РМЖ, рак яичников, рак желудка, рак легких, карцинома поджелудочной железы	РМЖ – MCF-7 Глиобластомы – U373, Daoy Рабдомиосаркома – SJCRH30 Рак яичников – SKOV3
	GD2 – ганглиозид G2	Нейробластома	Ретинобластомы – Y79, WERI-rb-1 Нейробластомы – IMR-32, LAN-1, SKNLP, CHLA255
	MUC1 – протеогликан мембран эпителиальных клеток	Рак желудка, рак легкого, карцинома поджелудочной железы, РМЖ, печеночно-клеточная карцинома, глиома, карцинома толстой кишки	РМЖ – T47D, ZR-75, Hs578, SKBR-3, MCF7, BT 20, KPL-1 Рак предстательной железы – DU-145, PC-3 Холангиокарцинома – KKKU-100, KKKU-213A Рак пищевода – TE13, TE10, OE19
	MUC16 (CA-125) – протеогликан мембран эпителиальных клеток	Карцинома яичников, поджелудочной железы, шейки матки	Плоскоклеточная карцинома – A-431 Аденокарцинома поджелудочной железы – CAPAN-2 Иммутизированные кератиноциты – HaCaT Карцинома шейки матки – HeLa РМЖ – SK-BR-3
Внутриклеточное	NY-ESO-1 – антиген плоскоклеточной карциномы пищевода Нью-Йорк-1. Раково-тестикулярный антиген	Нейробластома, миелома, метастатическая меланома, синовиальная саркома, рак мочевого пузыря, рак пищевода, печеночно-клеточный рак, раки головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого (HMPJ), рак яичников, рак предстательной железы, РМЖ	Глиомы – DBTRG05-MG, SNB19 Меланома – M624, 1300mel, 624.38mel, A375, FM-82, FM-56, FM-6 Рак пищевода – BE-3 HMPJ – H1299 Множественная миелома – U266
	MART-1 – меланома-ассоциированный антиген, распознаваемый Т-клетками 1	Метастатическая меланома	Меланома – DM6, DM13, DM515, DM555, DM122, DM366
	MAGE-A4 – меланома-ассоциированный антиген 4. Раково-тестикулярный антиген	Рак пищевода, рак головы и шеи, рак желудка, рак яичников, рак эндометрия и др.	Меланома – A375, LB1751-MEL HMPJ – 11-18 Рак легкого – QG-56 Рак пищевода – KE4, TE10 Рак толстой кишки – SW480
	MAGE-A10 – меланома-ассоциированный антиген 10. Раково-тестикулярный антиген	HMPJ, рак мочевого пузыря, раки головы и шеи, меланома	Меланома – SK-MEL-37, Mel526, Mel624, A375 Миелома – IM9, EJM Рак предстательной железы – LNCaP
	WT-1 – опухолевый белок Вильямса 1	Глиобластома, рак почки, гастроинтестинальные стромальные опухоли, рак эндометрия, лейкозы, перитонеальная мезотелиома и др.	Лейкозы – RS4, MV4, ALL697, MEG-01, K562 Мезотелиомы – MESO-4, HMMME Рак почки – WiT49, WT17.94
	PRAME – антиген меланомы, преимущественно экспрессирующийся в опухолях. Раково-тестикулярный антиген	Меланотитарные опухоли, острые лейкозы, медуллобластома, РМЖ, плоскоклеточная карцинома пищевода, рак желудка, саркомы, множественная миелома	Меланома – Mel 1.14 Лейкозы – RS4, MV4 Рак почки – WiT49, WT17.94 Саркомы – SYO-1, L2701, L2521

аутосомную рецессивную мутацию гена *Prkdc*, продукт которого ответствен за восстановление двуцепочечных разрывов ДНК, и характеризующихся тяжелым комбинированным иммунодефицитом и сниженным количеством Т- и В-клеток в связи с нарушенной рекомбинацией *V(D)J*-генов, наблюдается в 20–50 % случаев [40]. Низкая приживаемость ксенотрансплантированных опухолей у мышей SCID и NOD/SCID, вероятно, связана с тем, что некоторые Т- и В-лимфоциты все же успешно реализуют рекомбинацию *V(D)J*-генов их рецепторов, в результате чего на периферии присутствуют функциональные лимфоциты с олигоклональным репертуаром Т- и В-клеточных рецепторов, что и обуславливает преимущественное использование данных мышей в экспериментах, где приживаемость опухоли является конечной точкой исследования [41]. Однако NOD/SCID-мыши считаются эффективным (успешность трансплантации до 100 %) реципиентом опухолевых линий лейкозов [42]. Создание мышей NOD/SCID/IL2R γ_{null} (NSG), характеризующихся дополнительным нокаутом γ -цепи рецептора ИЛ-2, и мышей RAG $^{-/-}$ (RAG1 $^{-/-}$ и/или RAG2 $^{-/-}$), характеризующихся нарушением в генах-активаторах *V(D)J*-рекомбинации, позволило получать до 95–100 % успешных трансплантаций опухолей за счет угнетения созревания НК-клеток и полного отсутствия функциональных Т- и В-клеток соответственно [35]. Также для NSG-мышей показана относительно длительная (до 9 нед) персистенция введенных терапевтических Т-лимфоцитов, что создает перспективную модель для изучения механизмов их взаимодействия с опухолью [43].

Характеристика линий мышей, используемых в модели опухолевых ксенотрансплантатов, представлена в табл. 2.

Гомеостаз мыши поддерживает опухоль в условиях, приближенных к организму человека и более физиологичных по сравнению с условиями *in vitro*. Так, температура тела мыши равна центральной температуре тела человека и составляет 37 °С. Концентрация глюкозы в крови мыши составляет 7 ммоль/л, что в 1,5–3 раза ниже концентраций, используемых в большинстве культуральных сред. В отличие от культуральной среды, в организме мыши присутствуют все необходимые для роста опухоли аминокислоты и другие нутриенты [14]. Парциальное давление кислорода и насыщение гемоглобина кислородом у мыши составляют 90–100 мм рт. ст. и более 95 %, что близко к показателям человека и значительно отличается от условий *in vitro* [44]. Не менее важно, что с течением времени в организме мыши происходит изменение концентрации введенного терапевтического агента. Так, после начального пика концентрации в крови терапевтического агента, в том числе клеточного препарата, происходит его распределение в тканях и накопление в органах-мишенях с последующим метаболизмом и выведением из тканей, что приводит к необходимости вычисления дозировки

и кратности введения, достаточных для достижения терапевтического эффекта [1], приближая модель к клиническим условиям.

Методика ксенотрансплантации опухолевых клеток

Опухолевые клетки могут быть введены мышам местно, в том числе орто- и эктопически, а также системно (внутривенно или внутрисердечно). Наиболее часто используется местное эктопическое подкожное введение опухолевых клеток. Такой способ введения обеспечивает достаточный уровень успешных трансплантаций опухоли, удобен для исполнения и ручного мониторинга развития опухоли с помощью штангенциркуля. При освоении необходимых хирургических техник возможно введение опухолевой линии ортотопически, т. е. в ткань или орган происхождения опухолевой линии, в том числе в такие труднодоступные органы, как мозг и сетчатка [37, 45]. В отличие от подкожного, ортотопическое введение обеспечивает релевантное тканеспецифичное микроокружение и метаболизм опухоли, что может способствовать получению более достоверных результатов при изучении терапевтического эффекта адоптивной Т-клеточной терапии, а также при изучении взаимодействия опухоли с паренхимой органа и иммунной системой [46]. При ортотопической ксенотрансплантации опухолевых клеток возможно воспроизведение сопутствующих заболеваний целевого органа, например индукции цирроза при трансплантации опухолевой линии печеночно-клеточной карциномы [47], что еще больше приближает модель опухолевых ксенотрансплантатов на мышах к клинически наблюдаемым злокачественным новообразованиям. Системное внутривенное или внутрисердечное введение опухолевых линий используется для моделирования гематологических опухолей [48], а также метастазирующих солидных злокачественных новообразований [49]. При трансплантации мышам гематологических опухолей для увеличения приживаемости предварительно проводится дополнительная иммуносупрессия с помощью высокоэнергетического облучения [42].

Технически для подкожного введения опухолевого ксенотрансплантата мышам инъецируют $1-5 \cdot 10^6$ опухолевых клеток в объеме 50–100 мкл [50, 51]. Для ортотопического введения используют меньшие количества клеток ($1-5 \cdot 10^4$) в меньшем объеме (1–2,5 мкл) [37, 45]. Для системного введения используют до 10^7 опухолевых клеток [42]. Местное введение опухолевых клеток возможно в биологически активном геле для стимуляции ангиогенеза и увеличения шанса успешной трансплантации, а также для исключения нежелательного распространения опухолевых клеток и формирования правильной шарообразной формы опухоли, удобной для измерения [51]. При трансплантации первичных опухолей, полученных от пациентов, свежерезецированную опухоль нарезают на фрагменты размером 5×5×5 мм и помещают один из них под кожу через небольшой

Таблица 2. Характеристика линий мышей, используемых в модели опухолевых ксенотрансплантатов

Линия мышей	Описание	Успешность трансплантации опухоли	Особенности
Nude (<i>nu/nu</i>)	Мутация гена <i>Foxn1</i> , нарушение в развитии железистого эпителия, отсутствие тимуса, сниженное число функциональных Т-лимфоцитов	>75 %	Отсутствие шерсти удобно для измерения размеров опухоли вручную и методами визуализации <i>in vivo</i>
SCID, NOD/SCID	Мутация гена <i>Prkdc</i> , продукт которого ответствен за восстановление двуцепочечных разрывов ДНК. Т- и В-клеточный дефицит в связи с нарушенной рекомбинацией <i>V(D)J</i> -генов	20–50 % для солидных опухолей до 100 % для гематологических опухолей	Наличие небольшого количества Т- и В-лимфоцитов с олигоклональным репертуаром рецепторов. Нарушение репарации ДНК во всех клетках организма. Высокая вероятность успешной трансплантации гематологических опухолей
NOD/SCID/IL2R γ _{null} (NSG)	То же, что и SCID, NOD/SCID с дополнительным нокаутом γ -цепи рецептора ИЛ-2. Т- и В-клеточный дефицит, отсутствие созревания НК-клеток	95–100 %	Длительная персистенция адоптивно внесенных клеток. Нарушение репарации ДНК во всех клетках организма. Наличие небольшого количества Т- и В-лимфоцитов с олигоклональным репертуаром рецепторов
RAG $^{-/-}$ (RAG1 $^{-/-}$ и/или RAG2 $^{-/-}$)	Нокаут генов активации рекомбинации <i>RAG1</i> и <i>RAG2</i> вместе или по отдельности. Отсутствие функциональных Т- и В-лимфоцитов	95–100 %	Полное отсутствие функциональных Т- и В-клеток. Сохранность репарации ДНК в остальных клетках организма

разрез [40, 41]. Введенный подкожно опухолевый ксенотрансплантат становится визуально заметным и пальпируемым через 1–4 мес после введения опухолевых клеток, а иногда и через 1,5 года [40].

Конечной точкой экспериментов по изучению эффективности клеточных препаратов на модели опухолевых ксенотрансплантатов может быть получение данных как об относительном количестве успешно привитых опухолей на фоне превентивной терапии [41], так и о динамике роста ксенотрансплантированной опухоли при проведении эрадикационной терапии [50, 51]. Динамика роста опухоли, привитой подкожно, классически изучается путем периодического измерения ее длины и ширины штангенциркулем и последующего вычисления объема по формуле (длина $\times$ ширина²)/2 [50, 51] или других ее вариаций [52]. Однако в случае формирования опухоли неправильной формы и при ортотопической трансплантации опухоли такой способ измерения ее роста будет неинформативен и невозможен к применению, соответственно. Поэтому в современных исследованиях для изучения динамики роста и распространения опухоли все чаще используют неинвазивные методы визуализации опухоли, такие как МРТ, КТ, ПЭТ, и детекцию люминесценции меченных опухолевых клеток в организме мыши. Помимо более точного определения объема опухоли, к преимуществам данных методов относится возможность изучения метаболизма опухоли, в том числе оксигенации [53]

и поглощения глюкозы [54], метастазирования [55], морфологии опухоли [56] и экспрессии иммуноактивных молекул на опухолевых клетках [21]. При мечении терапевтических Т-клеток, используемых для адоптивного переноса, с помощью методов визуализации *in vivo* возможно изучение динамики их распределения в организме, накопления в опухолевом очаге и взаимодействия с опухолью [55]. Характеристика методов визуализации *in vivo*, в том числе разрешающая способность, чувствительность и необходимые вспомогательные материалы представлены в работе G. Kramer-Marek и соавт. [57].

Для гематологических опухолей динамику опухолевой нагрузки можно проследить с помощью анализа периферической крови на предмет относительного или абсолютного количества опухолевых клеток [42]. Также степень опухолевой прогрессии отражается в снижении массы тела мыши, что актуально при работе со сложно визуализируемыми моделями опухолей [50].

При достижении опухолью больших размеров (например, >15 мм в одном из диаметров), большого объема (500–2000 мм³), изъязвлении опухоли, потери мышью 20–25 % массы тела, нарушении жизнедеятельности мышью подвергают эвтаназии по гуманным причинам [37, 50]. При этом опухоль может быть резецирована, рассечена на меньшие фрагменты и имплантирована следующей мыши, что будет являться пассивированием опухоли *in vivo* [40].

Ограничения и перспективы

Несмотря на то что уже продолжительное время происходит стандартизация модели опухолевых ксенотрансплантатов за счет использования хорошо охарактеризованных линий опухолевых клеток, линий инбредных мышей и применения современных методов визуализации опухоли *in vivo* для изучения ее роста, все еще остается множество причин, приводящих к вариации полученных экспериментальных данных. Так, причиной вариаций в успешности трансплантации опухоли и динамике ее роста даже у инбредных мышей могут быть пол мышей, состав микробиоты кишечника и стрессовые условия внешней среды [1]. Используемые опухолевые линии, прошедшие длительные периоды пассирования *in vitro*, могут не отражать реальные фенотип и морфологию первичных опухолей [34], что может приводить к неадекватной оценке терапевтического эффекта изучаемых клеточных препаратов. Первичные опухолевые ксенотрансплантаты, полученные от пациентов, более полно отражают свойства злокачественных новообразований человека [19], но в этом случае принципиально невозможно стандартизировать модель. Размер опухоли неправильной формы не может быть адекватно измерен вручную с помощью штангенциркуля, а результаты визуализации *in vivo* могут варьировать в зависимости от наличия шерсти на животном, времени дня и настройки прибора [22]. Описанные вариации на стадии доклинических исследований приводят к успешному прохождению клинических испытаний лишь 3,4–5,1 % противоопухолевых препаратов [58].

Для преодоления проблемы экспериментальных вариаций на доклинической стадии в последнее время активно разрабатывается технология «рака на чипе», которая представляет собой подложку с опухолевыми клетками (возможно с множеством видов опухолевых клеток), имитирующую различные параметры опухолевого микроокружения, такие как градиенты питательных веществ, взаимодействие со стромальными клетками, ангиогенез, изменение концентраций терапевтического агента, механическая стимуляция клеток [59]. Результаты, полученные в модели «рака на чипе», уже сейчас коррелируют с данными, полученными в модели ксенотрансплантированных опухолей [60]. И в будущем «рак на чипе» может стать наиболее удобной моделью тестирования противоопухолевых препаратов за

счет возможности одновременного тестирования сразу множества фармакологических и клеточных препаратов на множестве гетерогенных видов опухолевых клеток, в том числе полученных от пациентов, что откроет дверь к быстрому персонализированному подбору препаратов, который сейчас ограничен длительностью постановки модели опухолевых ксенотрансплантатов [60]. Также «рак на чипе» может обеспечить условия тестирования, недоступные для ксенотрансплантатной модели, например взаимодействие с клетками стромы и иммунной системы человека, и снизить вероятность экспериментальных вариаций за счет строго регламентированного производства [1].

Заключение

Несмотря на некоторые ограничения модель опухолевых ксенотрансплантатов является «золотым стандартом» для доклинических испытаний противоопухолевой иммунотерапии, в том числе терапии генетически модифицированными Т-лимфоцитами. Модель опухолевых ксенотрансплантатов обеспечивает воспроизведение множества важных аспектов опухолевого роста. Так, модель воспроизводит трехмерную васкуляризованную опухоль в организме с поддерживающимся гомеостазом, метаболизмом и возможными механизмами толерантности к терапевтическому агенту. Длительное использование модели привело к появлению хорошо охарактеризованных опухолевых клеточных линий и линий инбредных мышей, обеспечивающих воспроизводимость модели, а также методов визуализации *in vivo*, позволяющих не только более точно описывать рост новообразования, но и отслеживать введенный терапевтический клеточный продукт и его взаимодействие с опухолью. А современные подходы к трансплантации первичных опухолей, полученных от пациентов, позволяют более полно имитировать внутри- и межопухолевую гетерогенность, наблюдаемую в клинической практике, что позволит еще больше сократить разрыв в эффективности препаратов на этапах доклинических и клинических испытаний.

Вклад авторов. Анализ данных литературы, написание статьи, подготовка рисунков и таблиц – Терещенко В.П.; редактирование и утверждение окончательного текста статьи – Сенников С.В.

Литература/References

1. Komen J., van Neerven S.M., van den Berg A., Vermeulen L., van der Meer A.D. Mimicking and surpassing the xenograft model with cancer-on-chip technology. *EBioMedicine*. 2021; 66: 103303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103303>
2. Joshi S.S., Jackson J.D., Sharp J.G. Comparison of the Growth and Metastasis of Four Human Intestinal Tumor Cell Line Xenografts. *Tumor Biol*. 1989; 10: 117–25. DOI: <https://doi.org/10.1159/000217607>
3. Benzekry S., Lamont C., Beheshti A., Tracz A., Ebos J.M.L., Hlatky L., et al. Classical Mathematical Models for Description and Prediction of Experimental Tumor Growth. *PLoS Comput. Biol*. 2014; 10: e1003800. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003800>
4. Laird A.K. Dynamics of Tumour Growth: Comparison of Growth Rates and Extrapolation of Growth Curve to One Cell. *Br. J. Cancer*. 1965; 19: 278–91. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1965.32>
5. Simeoni M., De Nicolao G., Magni P., Rocchetti M., Poggesi I. Modeling of human tumor xenografts and dose rationale in oncology. *Drug Discov. Today Technol*. 2013; 10: e365–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.07.004>
6. Yarwood S.J., Woodgett J.R. Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 4472–7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.081069098>
7. Naba A., Clauser K.R., Hoersch S., Liu H., Carr S.A., Hynes R.O. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo

Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012; 11: M111.014647. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>

8. Mesker W.E., Junggeburst J.M.C., Szuhai K., de Heer P., Morreau H., Tanke H.J., et al. The Carcinoma–Stromal Ratio of Colon Carcinoma Is an Independent Factor for Survival Compared to Lymph Node Status and Tumor Stage. *Anal. Cell Pathol.* 2007; 29: 387–98. DOI: <https://doi.org/10.1155/2007/175276>

9. Mueller M.M., Fusenig N.E. (eds). *Tumor-Associated Fibroblasts and their Matrix*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0659-0>

10. Schneeberger V.E., Allaj V., Gardner E.E., Poirier J.T., Rudin C.M. Quantitation of Murine Stroma and Selective Purification of the Human Tumor Component of Patient-Derived Xenografts for Genomic Analysis. *PLoS One*. 2016; 11: e0160587. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160587>

11. Yoshida G.J., Azuma A., Miura Y., Orimo A. Activated Fibroblast Program Orchestrates Tumor Initiation and Progression; Molecular Mechanisms and the Associated Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 2256. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20092256>

12. Hillen F., Griffioen A.W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 489–502. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9094-7>

13. Forster J., Harriss-Phillips W., Douglass M., Bezak E. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. *Hypoxia*. 2017; 5: 21–32. DOI: <https://doi.org/10.2147/HP.S133231>

14. Sullivan M.R., Danai L.V., Lewis C.A., Chan S.H., Gui D.Y., Kunchuk T., et al. Quantification of microenvironmental metabolites in murine cancers reveals determinants of tumor nutrient availability. *Elife*. 2019; 8: e44235. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.44235>

15. Burrell R.A., McGranahan N., Bartek J., Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013; 501: 338–45. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12625>

16. Meacham C.E., Morrison S.J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013; 501: 328–37. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12624>

17. Lenos K.J., Miedema D.M., Lodestijn S.C., Nijman L.E., van den Bosch T., Romero Ros X., et al. Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20: 1193–202. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0179-z>

18. van der Heijden M., Miedema D.M., Waclaw B., Veenstra V.L., Lecca M.C., Nijman L.E., et al. Spatiotemporal regulation of clonogenicity in colorectal cancer xenografts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2019; 116: 6140–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1813417116>

19. Williams S.A., Anderson W.C., Santaguida M.T., Dylla S.J. Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab. Invest.* 2013; 93: 970–82. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.92>

20. Welker A.M., Jaros B.D., An M., Beattie C.E. Changes in tumor cell heterogeneity after chemotherapy treatment in a xenograft model of glioblastoma. *Neuroscience*. 2017; 356: 35–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.010>

21. Heskamp S., Hobo W., Molkenboer-Kuenen J.D.M., Olive D., Oyen W.J.G., Dolstra H., et al. Noninvasive Imaging of Tumor PD-L1 Expression Using Radiolabeled Anti-PD-L1 Antibodies. *Cancer Res.* 2015; 75: 2928–36. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3477>

22. Kim S., Zhang Y., Tang S., Qin C., Karelia D., Sharma A., et al. Optimizing live-animal bioluminescence imaging prediction of tumor burden in human prostate cancer xenograft models in SCID-NSG mice. *Prostate*. 2019; 79: 949–60. DOI: <https://doi.org/10.1002/pros.23802>

23. Киселевский М.В., Чикилева И.О., Ситдикова С.М., Влащенко Р.Я., Караулов А.В. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным Т-клеточным рецептором (CAR-Т-клеток) для терапии солидных опухолей. *Иммунология*. 2019; 40 (4): 48–55. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-14006> [Kiselevsky M.V., Chikileva I.O., Sitydikova S.M., Vlasenko R.Ya., Karaulov A.V. Prospectives of application of the genetically modified lymphocytes with chimeric T-cell receptor (CAR-T-cells) for the therapy of solid tumors. *Immunologiya*. 2019; 40 (4): 48–55. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-14006> (in Russian)]

24. Davenport A.J., Cross R.S., Watson K.A., Liao Y., Shi W., Prince H.M., et al. Chimeric antigen receptor T cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2018; 115: E2068–76. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1716266115>

25. Mamonkin M., Rouce R.H., Tashiro H., Brenner M.K. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*. 2015; 126: 983–92. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629527>

26. Liadi I., Singh H., Romain G., Rey-Villamizar N., Merouane A., Adolacion J.R.T., et al. Individual Motile CD4 + T Cells Can Participate in Efficient Multikilling through Conjugation to Multiple Tumor Cells. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3: 473–82. DOI: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0195>

27. Janssen E.M., Lemmens E.E., Wolfe T., Christen U., von Herrath M.G., Schoenberger S.P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 2003; 421: 852–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01441>

28. Hassin D., Garber O.G., Meiraz A., Schiffenbauer Y.S., Berke G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*. 2011; 133: 190–6. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03426.x>

29. Davenport A.J., Jenkins M.R., Cross R.S., Yong C.S., Prince H.M., Ritchie D.S., et al. CAR-T Cells Inflict Sequential Killing of Multiple Tumor Target Cells. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3: 483–94. DOI: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0048>

30. Van Acker H.H., Ma S., Scolari T., Kaech S.M., Mazzone M. How metabolism bridges cytotoxic CD8+ T cells through epigenetic modifications. *Trends Immunol.* 2021; 42: 401–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.03.006>

31. D'Aloia M.M., Zizzari I.G., Sacchetti B., Pierelli L., Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 282. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0278-6>

32. McLane L.M., Abdel-Hakeem M.S., Wherry E.J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2019; 37: 457–95.

33. Zhang J., Wang L. The Emerging World of TCR-T Cell Trials Against Cancer: A Systematic Review. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2019; 18: 153303381983106. DOI: <https://doi.org/10.1177/1533033819831068>

34. Roschke A.V., Tonon G., Gehlhaus K.S., McTyre N., Bussey K.J., Lababidi S., et al. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res.* 2003; 63: 8634–47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695175>

35. Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., Jimeno A., Leong S., Pitts T.M., et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012; 9: 338–50.

36. Yamada R., Takahashi A., Torigoe T., Morita R., Tamura Y., Tsukahara T., et al. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens*. 2013; 81: 428–34. DOI: <https://doi.org/10.1111/tan.12113>

37. Wang K., Chen Y., Ahn S., Zheng M., Landoni E., Dotti G., et al. GD2-specific CAR T cells encapsulated in an injectable hydrogel control retinoblastoma and preserve vision. *Nat. Cancer*. 2020; 1: 990–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00119-y>

38. Akahori Y., Wang L., Yoneyama M., Seo N., Okumura S., Miyahara Y., et al. Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. *Blood*. 2018; 132: 1134–45.

39. Li T., Wang J. Therapeutic effect of dual CAR-T targeting PDL1 and MUC16 antigens on ovarian cancer cells in mice. *BMC Cancer*. 2020; 20: 678. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07180-x>

40. Morton C.L., Houghton P.J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* 2007; 2: 247–50.

41. John T., Kohler D., Pintilie M., Yanagawa N., Pham N.-A., Li M., et al. The Ability to Form Primary Tumor Xenografts Is Predictive of Increased Risk of Disease Recurrence in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 134–41.

42. Lock R.B., Liem N., Farnsworth M.L., Milross C.G., Xue C., Tajbakhsh M., et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002; 99: 4100–8.

43. Simpson-Abelson M.R., Sonnenberg G.F., Takita H., Yokota S.J., Conway T.F., Kelleher R.J., et al. Long-Term Engraftment and Expansion of Tumor-Derived Memory T Cells Following the Implantation of Non-Disrupted Pieces of Human Lung Tumor into NOD-scid IL2Rγ null Mice. *J. Immunol.* 2008; 180: 7009–18.
44. Lee E.J., Woodske M.E., Zou B., O'Donnell C.P. Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 2009; 107: 290–4.
45. Ahmed N., Salsman V.S., Kew Y., Shaffer D., Powell S., Zhang Y.J., et al. HER2-Specific T Cells Target Primary Glioblastoma Stem Cells and Induce Regression of Autologous Experimental Tumors. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 474–85. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1322>
46. Yu V.Z., Ip J.C.Y., Ko J.M.Y., Tao L., Lam A.K., Lung M.L. Orthotopic Xenograft Mouse Model in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Methods Mol. Biol.* 2020; 2129: 149–60.
47. Reiberger T., Chen Y., Ramjiawan R.R., Hato T., Fan C., Samuel R., et al. An orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma with underlying liver cirrhosis. *Nat. Protoc.* 2015; 10: 1264–74.
48. Sterner R.M., Sakemura R., Cox M.J., Yang N., Khadka R.H., Forsman C.L., et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood.* 2019; 133: 697–709.
49. Gril B., Wei D., Zimmer A.S., Robinson C., Khan I., Difilipantonio S., et al. HER2 antibody-drug conjugate controls growth of breast cancer brain metastases in hematogenous xenograft models, with heterogeneous blood tumor barrier penetration unlinked to a passive marker. *Neuro Oncol.* 2020; 22: 1625–36.
50. Fu J., Shang Y., Qian Z., Hou J., Yan F., Liu G., et al. Chimeric Antigen receptor-T (CAR-T) cells targeting Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) can inhibit tumor growth in ovarian cancer mouse model. *J. Vet. Med. Sci.* 2021; 83: 241–7. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0455>
51. Textor A., Grunewald L., Anders K., Klaus A., Schwiebert S., Winkler A., et al. CD28 Co-Stimulus Achieves Superior CAR T Cell Effector Function against Solid Tumors Than 4-1BB Co-Stimulus. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1050. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13051050>
52. McCormack E., Adams K.J., Hassan N.J., Kotian A., Lissin N.M., Sami M., et al. Bi-specific TCR-anti CD3 redirected T-cell targeting of NY-ESO-1- and LAGE-1-positive tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013; 62: 773–85. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1384-4>
53. Shi Y., Oeh J., Eastham-Anderson J., Yee S., Finkle D., Peale F.V., et al. Mapping In Vivo Tumor Oxygenation within Viable Tumor by 19F-MRI and Multispectral Analysis. *Neoplasia.* 2013; 15: 1241-IN1.
54. Xu Z., Ding H., Fu T., Zhu Y., Wang W. A Nude Mouse Model of Orthotopic Liver Transplantation of Human Hepatocellular Carcinoma HCCLM3 Cell Xenografts and the Use of Imaging to Evaluate Tumor Progression. *Med. Sci. Monit.* 2019; 25: 8694–703.
55. Chen Y., Sun C., Landoni E., Metelitsa L., Dotti G., Savoldo B. Eradication of Neuroblastoma by T Cells Redirected with an Optimized GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and Interleukin-15. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25: 2915–24. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1811>
56. Xue W., Ton H., Zhang J., Xie T., Chen X., Zhou B., et al. Patient-derived orthotopic xenograft glioma models fail to replicate the magnetic resonance imaging features of the original patient tumor. *Oncol Rep.* 2020; 43: 1619–29.
57. Kramer-Marek G., Gore J., Korc M. Molecular imaging in pancreatic cancer – a roadmap for therapeutic decisions. *Cancer Lett.* 2013; 341: 132–8.
58. Wong C.H., Siah K.W., Lo A.W. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics.* 2019; 20: 273–86.
59. Ayuso J.M., Virumbrales-Muñoz M., Lacueva A., Lanuza P.M., Checa-Chavarria E., Botella P., et al. Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. *Sci. Rep.* 2016; 6: 36086.
60. Eduati F., Utharala R., Madhavan D., Neumann U.P., Long-erich T., Cramer T., et al. A microfluidics platform for combinatorial drug screening on cancer biopsies. *Nat. Commun.* 2018; 9: 2434.

Сведения об авторах

Терещенко Валерий Павлович – канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИФКИ Минобрнауки России, Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: tervp91@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1620-6447>

Сенников Сергей Витальевич – д-р мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИФКИ Минобрнауки России, Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Authors' information

Valeriy P. Tereshchenko – PhD, Researcher of the Molecular Immunology Lab., RIFCI of the MSHE of Russia, Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: tervp91@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1620-6447>

Sergey V. Sennikov – MD, PhD, Prof., Head of the Molecular Immunology Lab., RIFCI of the MSHE of Russia, Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>