

Актуальные подходы к оценке биологической активности иммуноцитокинов в условиях *in vitro*

К.М. Коноплина, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ксения Михайловна Коноплина konoplinakm@gmail.com

Применение цитокинов в качестве противоопухолевых препаратов ограничено их токсичностью и побочными эффектами системного введения. Одним из способов снижения токсичности и повышения терапевтического индекса является применение их в виде конъюгатов с антителами – иммуноцитокинов. Результаты доклинических исследований показали повышенную эффективность и сниженную токсичность различных иммуноцитокинов по сравнению с исходными, неконъюгированными, цитокинами. Потенциал иммуноцитокинов как противоопухолевых препаратов в настоящее время изучается в рамках клинических исследований. Терапевтическая эффективность иммуноцитокинов зависит от их физико-химических параметров, определяющих биораспределение *in vivo*, и биологической активности как результата используемых в дизайне механизмов действия антительного и цитокинового участков. Для характеристики биологической активности иммуноцитокинов на раннем этапе исследования необходимы методы, позволяющие оценить биологическую активность как отдельных участков, так и целой молекулы иммуноцитокина.

В настоящем обзоре рассматриваются существующие подходы к оценке биологической активности иммуноцитокинов *in vitro* в ходе доклинических исследований: с использованием монослойных клеточных культур, репортерных клеточных систем, совместных культур, трехмерных (3D) моделей опухолей. Монослойных культур достаточно для подтверждения используемого в дизайне иммуноцитокина механизма действия его отдельных участков, и тест-системы «золотого стандарта» для определения специфической биологической активности цитокина и эффекторных функций антительного участка остаются востребованными. Коммерческие репортерные клеточные системы являются альтернативным вариантом оценки биологической активности цитокинового и антительного участков на уровне активации сигнальных путей. Совместные культуры опухолевых и эффекторных клеток позволяют оценить цитотоксический и иммуномодулирующий эффекты антительного и цитокинового участков без использования методов 3D-культивирования. Использование 3D-моделей опухолей позволяет заменить несколько тестов на биологическую активность отдельных участков иммуноцитокина, проводимых на монокультурах и совместных культурах, на одно комплексное исследование, однако такие модели требуют значительных временных и материальных затрат.

Ключевые слова: иммуноцитокин, биологическая активность, механизм действия

Для цитирования: Коноплина К.М., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Актуальные подходы к оценке биологической активности иммуноцитокинов в условиях *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3): 10–22. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-10-22

Current approaches to assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro*

Ksenia M. Konoplina, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Ksenia Mikhailovna Konoplina konoplinakm@gmail.com

The use of cytokines as anticancer drugs is limited due to their toxicity. It is possible to reduce toxicity and to increase the therapeutic index by using cytokines in the form of conjugates with antibodies – immunocytokines. The results of preclinical studies have shown increased efficacy and reduced toxicity of various immunocytokines compared to the original, unconjugated cytokines. The potential of immunocytokines as anticancer agents is currently being studied in clinical trials. The therapeutic efficacy of immunocytokines depends on their physicochemical parameters, which determine the *in vivo* biodistribution, and biological activity as a result of the mechanisms

of the antibody action and cytokine sites incorporated in the design. There is a need for methods that allow to assess the biological activity of both individual sites and the entire immunocytokine molecule when characterizing immunocytokines at an early stage of research.

This review considers the existing approaches for assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro* in the course of preclinical studies, such as monolayer cultures, reporter cell lines, co-cultures, three-dimensional (3D) tumor models. Monolayer cultures are sufficient to confirm the mechanism of action of separate sites of immunocytokines used in the design, and the “gold standard” test systems for determining the specific biological activity of the cytokine and the effector functions of the antibody site remain in demand. Commercial reporter cell lines remain an alternative option for assessing the biological activity of cytokine and antibody sites at the level of activation of signaling pathways. Co-cultures of tumor and effector cells make it possible to evaluate the cytotoxic and immunomodulatory effects of antibody and cytokine sites without using 3D cultivation methods. The use of 3D tumor models makes it possible to replace several tests for the biological activity of separate sites of immunocytokines conducted on monolayer cultures and co-cultures with one comprehensive study, however, such models require significant time and material costs.

Keywords: immunocytokine, biological activity, mechanism of action

For citation: Konoplina K.M., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Current approaches to assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro*. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022; 21(3):10–22. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-10-22

Введение

Применение цитокинов в высоких дозах является одним из вариантов противоопухолевой иммунотерапии [1, 2], однако использование цитокинов в терапевтических дозах сопровождается системной токсичностью и побочными эффектами. Один из способов повышения эффективности действия цитокинов и снижения их токсичности — таргетная доставка в опухоль с помощью антитела. Такие конъюгаты на основе антител и цитокинов, названные иммуноцитокинами (ИЦ), начали разрабатывать с начала 1990-х годов.

Общая концепция механизма действия противоопухолевого иммунотерапевтического ИЦ заключается в следующем. За счет антительного участка, таргетированного к антигену на поверхности опухолевой клетки либо к мишени в микроокружении опухоли, ИЦ накапливается в опухоли. Здесь цитокин, связываясь с соответствующими рецепторами на поверхности опухолевой и/или иммунной клетки, передает сигнал внутрь клетки и индуцирует противоопухолевый ответ. В зависимости от свойств используемого цитокина противоопухолевый ответ может быть обусловлен как прямым действием цитокина на опухолевую клетку, так и действием цитокина на иммунные клетки в микроокружении опухоли с последующей индукцией иммунного ответа на опухоль. Помимо этого, ИЦ может оказывать противоопухолевый эффект за счет антительного участка (см. рисунок): в случае сохранения одной либо нескольких эффекторных функций и/или наличия блокирующей функции при таргетированности антительного участка к рецептору фактора роста (например, HER2/неу).

За последние 30 лет получено и протестировано в условиях *in vitro* и на различных мышиных моделях опухолей более 100 ИЦ [3]. Более 10 ИЦ разного

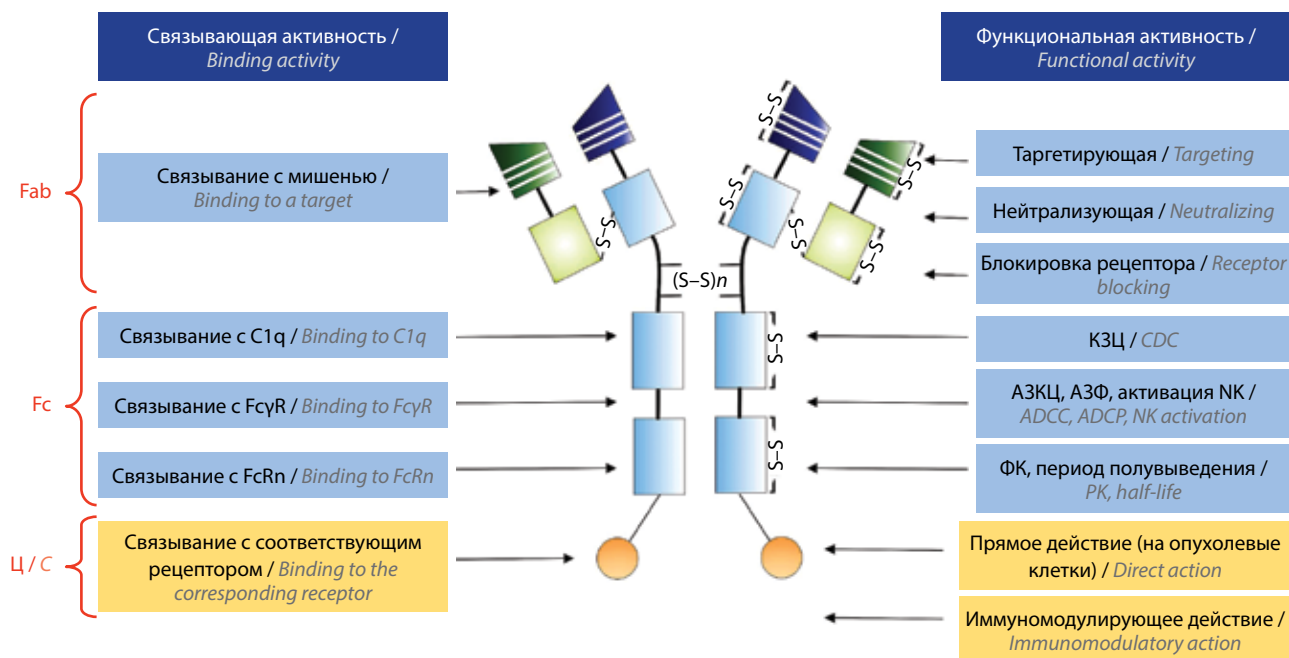
формата на основе интерферона (IFN) α , интерлейкинов (IL) 2, 12 и фактора некроза опухоли (TNF) в настоящее время находятся в фазах I–III клинических испытаний [4, 5]. Несколько клинических испытаний ИЦ были преждевременно закончены по причине недостаточного набора пациентов [5] либо по решению спонсора [6], и на момент 2022 г. нет ИЦ, одобренных регуляторными органами для клинического применения.

Распространенный подход к доклинической характеристике ИЦ как потенциальных противоопухолевых препаратов заключается в определении биологической активности цитокинового и антительного участков по отдельности с помощью традиционных клеточных тест-систем. Иммунотерапевтическое действие ИЦ, как и других кандидатных противоопухолевых препаратов, оценивают с помощью мышиных моделей опухолей, имеющих определенные ограничения [7].

В настоящем обзоре рассматриваются существующие подходы к оценке биологической активности ИЦ *in vitro* в ходе доклинических исследований: с использованием монослойных клеточных культур, репортерных клеточных систем, совместных культур, 3D-моделей опухолей. Анализируется выбор методов для оценки биологической активности ИЦ в зависимости от используемых в дизайне функций антительного и цитокинового участков.

Краткие сведения об иммуноцитокинах: строение, функции, модификации

Иммуноцитокины представляют собой сложные белковые молекулы на основе моноклонального антитела либо его фрагмента и цитокина; антительный и цитокиновый участки генетически соединены линкером. Терапевтическая эффективность таких сложных



Строение и функции иммуноцитокина на основе полноразмерного иммуноглобулина класса G. АЗКЦ — антителозависимая клеточная цитотоксичность; АЗФ — антителозависимый фагоцитоз; КЗЦ — комплементзависимая цитотоксичность; NK — натуральные киллерные клетки; ФК — фармакокинетика; Ц — цитокин; C1q — компонент комплемента Iq; Fab-фрагмент — антигенсвязывающий фрагмент антитела; FcRn — неонатальный рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина класса G; FcγR — рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина класса G; Fc-фрагмент — кристаллизуемый фрагмент антитела

Structure and functions of an immunocytokine based on full-size IgG. ADCC — antibody-dependent cell cytotoxicity; ADCP — antibody-dependent cellular phagocytosis; CDC — complement-dependent cytotoxicity; NK — natural killer cells; PK — pharmacokinetics; C — cytokine; C1q — complement component Iq; Fab — fragment antigen binding; FcRn — neonatal Fc receptor; FcγR — Fc-gamma receptors; Fc — fragment crystallizable

биомолекул в условиях *in vivo* зависит от ряда параметров, среди которых тип мишени, формат и функциональный вариант антительного и цитокинового участков ИЦ, тип линкера между антительным и цитокиновым участками ИЦ, а также доза, режим введения ИЦ и возможность комбинирования с другими типами противоопухолевой терапии [8]. Выбор цитокина, антитела и другие вопросы, возникающие при конструировании ИЦ, подробно рассмотрены в работе Р.А. Young и соавт. [9].

Антительный участок ИЦ, находящихся в клинических исследованиях, представлен химерными, гуманизированными и человеческими полноразмерными иммуноглобулинами (Ig), главным образом подклассов IgG1 и IgG3; полноразмерным IgG с гетеродимерным Fc-фрагментом, полученным по технологии knob-into-hole; вариантами фрагментов антител (главным образом используется одноцепочечный вариабельный фрагмент scFv) в виде моно- и мультимеров [3].

Основная функция антительного участка ИЦ — таргетирующая — одновременно может быть блокирующей, если мишень является антигеном, ассоциированным с опухолью, например: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2/neu) и др.

В качестве мишеней также используются антигены, расположенные на опухолевых кровеносных сосудах и во внеклеточном матриксе опухоли: альтернативно сплайсированные участки фибронектина А и В, факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и их рецепторы, раково-эмбриональный антиген СЕА, домен А1 тенасина С; исследуются в качестве мишени комплексы ДНК с гистонами (полный перечень см. в обзорах [3]).

Помимо таргетирующей могут быть желательны эффекторные функции антительного участка для улучшения общей противоопухолевой эффективности ИЦ: антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимая цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз (АЗФ), индукция апоптоза, ведущие к лизированию опухолевых клеток. В этом случае ИЦ конструируют на основе полноразмерного IgG либо scFv-Fc, либо мини-антител (два scFv, соединенные с CH3-доменом IgG) [3], при этом возможны модификации Fc-фрагмента, направленные на аффинность связывания с Fcγ-рецепторами на лейкоцитах, для усиления, ослабления определенной эффекторной функции либо ее отмены [10].

Цитокиновый участок при конструировании противоопухолевого ИЦ выбирают, основываясь на эффективности его использования в клинической

практике в отношении определенного спектра опухолей. Противоопухолевая активность цитокинового участка может проявляться как за счет прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, так и за счет непрямого иммуномодулирующего.

Прямое противоопухолевое действие цитокина может заключаться в подавлении пролиферации, индукции апоптоза, стимуляции экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I и II типа на поверхности опухолевых клеток [11], а иммуномодулирующее действие — в повышении активности эффекторных иммунных клеток (IL-2, IFN 1-го типа), индукции созревания антигенпрезентирующих клеток (IL-2, 6, 7, 13, 15 [12], IFN 1-го типа), индукции повышенной экспрессии белков, в частности цитокинов (IFN 1-го типа) [11]. Помимо этого, некоторые цитокины в случае применения их с полноразмерными противоопухолевыми антителами способны усиливать функции Fc-фрагмента антитела (АЗКЦ, АЗФ) за счет активации эффекторных клеток (натуральных киллеров (NK), макрофагов) (IFN 1-го типа, IL-2, 12, 15, 21).

За последние несколько лет в составе ИЦ были протестированы более 30 цитокинов: ряд IL (IL-1 β , 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 18, 21); гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IFN- α , γ и λ ; TNF; цитокины группы TNF; хемокины; различные гетеродимеры цитокинов [3]. В клинических исследованиях в настоящее время находятся ИЦ на основе IFN- α , IL-2, 12 и TNF [3, 4].

Известно, что использование цитокинов в терапевтических дозах сопровождается токсичностью. Проблему представляют побочные эффекты применения цитокинов, обусловленные присутствием цитокиновых рецепторов на нормальных тканях. Для устранения этих недостатков и повышения терапевтического индекса цитокинов разрабатываются различные стратегии «сужения» биологической активности цитокинового участка в составе ИЦ.

Распространенным способом «сужения» активности цитокина является модификация его аффинности к субъединицам соответствующих рецепторов. Так, S.D. Gillies и соавт. [13] с помощью точечной мутации модифицировали IL-2 в составе ИЦ таким образом, чтобы цитокин сохранил способность связываться и активировать только высокоаффинный рецептор IL-2R, состоящий из 3 субъединиц. S.L. Pogue и соавт. [14] методом сайт-направленного мутагенеза ослабили аффинность IFN- α 2b к высокоаффинной цепи рецептора IFNAR—IFNAR2. В работах С. Klein и соавт. [15, 16] с помощью ряда точечных мутаций исключили взаимодействие IL-2 с CD25, α -субъединицей IL-2R и сохранили способность IL-2 связываться только с рецептором промежуточной аффинности.

Стоит отметить, что аффинность цитокина к соответствующим рецепторам в нормальных тканях может не только вызывать системную токсичность, но и препятствовать таргетирующей функции антигенового участка [17–19]; для решения такой проблемы модифицируют не только цитокин (см. выше), но и антигенсвязывающие сайты антигенового участка [15].

Другой способ «сужения» активности цитокина заключается в ее аллостерической регуляции. Было показано, что присоединенный к С-концу легкой цепи IgG цитокин проявляет активность после связывания антигенового участка с соответствующей мишенью [20, 21].

В случае мультимерных цитокинов возможно локализовать активность цитокина с помощью стратегии, основанной на сборке биологически неактивных субъединиц цитокина, генетически сшитых с таргетирующим антителом, в месте опухоли [22].

Используемые в дизайне ИЦ функции антигенового и цитокинового участков (см. рисунок) и их модификации не только задают биологическую активность ИЦ, но также определяют выбор формата клеточной тест-системы для дальнейшей характеристики биологической активности и терапевтической эффективности ИЦ.

Предварительная характеристика новых иммуноцитоклинов

Последовательность действий при исследовании нового ИЦ в условиях *in vitro* в общем случае включает следующие этапы. После выделения, очистки и характеристики ИЦ стандартными физико-химическими методами в бесклеточных системах проверяются полнота сборки молекулы ИЦ, лигандсвязывающая способность антигенового и цитокинового доменов.

Характеризацию ИЦ физико-химическими методами можно рассматривать как 1-й этап контроля качества полученного белка, позволяющий обнаружить нежелательные характеристики исследуемой молекулы. Так, с помощью электрофореза в полиакриламидном геле возможно предварительно оценить такие значимые для биораспределения параметры полученного ИЦ, как заряд, молекулярная масса и степень гликозилирования.

Простым и доступным способом подтверждения наличия антигенового и цитокинового доменов являются иммунологические методы, в частности возможно качественное определение обоих доменов одновременно методом иммуноферментного анализа. Например, для доказательства полноты сборки молекулы ИЦ на основе полноразмерного IgG к HER2/neu и IFN- α Е.Н. Кособокова и соавт. [23] разработали метод комбинированного иммуноферментного анализа,

в котором одни антитела были аффинны к IgG человека, другие — к IFN- α . Положительная реакция в такой тест-системе наблюдалась бы только в случае полноразмерного ИЦ, в котором и антительный, и цитокиновый домены связались с соответствующими специфическими антителами. В связи с отсутствием стандартного образца такой метод может дать только качественный результат.

Антигенсвязывающая способность антительного участка оценивается, как правило, методами поверхностного плазмонного резонанса (определяется аффинность связывания антитела с таргетным антигеном, характеризующая константой диссоциации) либо проточной цитометрии. Помимо этого, с целью оценки сохранения эффекторных функций антительного домена возможно проведение тестов (иммунологических либо на аффинность) на связывание с фактором комплемента C1q и с Fc- γ -рецепторами (Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA). Оценку связывающей активности цитокинового участка проводят, как правило, методом проточной цитометрии. Следует отметить, что определение (и сравнение) аффинности связывания антительного и цитокинового доменов с соответствующими лигандами может помочь выявить возможность нежелательного биораспределения ИЦ *in vivo* на раннем этапе.

Тест-системы на основе целевых монослойных и 3D-клеточных культур

Традиционные монослойные культуры, опухолевые и неопухолевые, остаются «золотым стандартом» клеточных тест-систем для оценки биологической активности цитокинового и антительного участков ИЦ по отдельности, поскольку отражают механизм действия исследуемого белка на уровне изменения фенотипа клеток-мишеней.

Монослойные культуры используют, чтобы оценить:

- прямую биологическую активность цитокина в отношении опухолевых и иммортализованных неопухолевых клеточных культур: подавление пролиферации (например, IFN- α), индукцию пролиферации (например, IL-2 с помощью клеточной линии CTLL-2), индукцию выработки других цитокинов (например, продукция IFN- γ при обработке NK-клеток IL-12), цитотоксичность (TNF), противовирусное действие (IFN- α), хемотаксис (хемотаксис), иммуномодулирующие свойства (активация макрофагов гранулоцитарным макрофагальным колониестимулирующим фактором). Примеры стандартных протоколов и общепринятых методов детекции результатов перечисленных воздействий — жизнеспособности клеток-мишеней, цитотоксичности — см. в обзоре A.R. Mire-Sluis и соавт. [24]. Помимо подтверж-

дения биологической активности, тест-системы на основе монослойных культур позволяют проводить отбор ИЦ с «суженной» активностью цитокина по значению полумаксимальной эффективной концентрации EC50 [25];

- блокирующую функцию антительного участка ИЦ на основе полноразмерного IgG. В этом случае Fc-зависимый апоптоз клеток-мишеней оценивают по активации каспазы-3 или каспазы-7, либо по экспозиции фосфатидилсерина на внешней клеточной мембране с помощью аннексина V либо его производных [26].

Как способ детекции цитотоксичности все большее распространение получает метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС), который позволяет осуществлять мониторинг концентрации клеток-мишеней, изменений в их морфологии (размер, форма), силы адгезии, цитолиза по изменению электрических свойств поверхности сенсора в дне каждой лунки специального планшета. Как следствие, метод ЭИС применим для оценки общей биологической активности ИЦ в отношении иммортализованных, первичных двумерных клеточных культур и совместных культур, а также некоторых 3D-клеточных культур [27, 28].

3D-культуры (см. ниже) неопухолевых клеток необходимы для оценки специфической биологической активности некоторых цитокинов. Так, для оценки такой функции IFN- α , как подавление ангиогенеза, эпителиальные клетки HUVEC выращивают на подложке Matrigel. Подавление пролиферации, миграции, инвазии и образования сосудов в результате воздействия ИЦ оценивают методом микроскопии (например, см. работу Z. Li и соавт. [29]).

Тест-системы на основе совместных клеточных культур

Эффекторные функции антительного участка в составе ИЦ оценивают на адгезионных совместных культурах с помощью того же ряда тестов, что используются для обычных антител: в общем случае клетки-мишени (как правило, опухолевые), экспрессирующие целевой антиген, инкубируются с эффекторными клетками и ИЦ. Детекцию жизнеспособности клеток-мишеней и цитотоксичности осуществляют как общепринятыми методами (см. в работе X.R. Jiang и соавт. [26]), так и с помощью ЭИС (например, работы K.E. Fenerty и соавт. [27], B. Xi и соавт. [28]).

В качестве источника эффекторных клеток при определении АЗКЦ могут использоваться NK, выделенные из мононуклеаров периферической крови; непосредственно мононуклеары периферической крови; линии NK с высокой экспрессией CD16a (Fc γ RIIIA), например линия NK92.CD16V. В случае комплементзависимой цитотоксичности используют

коммерческий либо полученный из донорской крови источник комплемента. При оценке АЗФ исследуемый ИЦ инкубируется с клетками-мишенями и цельной кровью либо с мононуклеарами периферической крови, либо с выделенными из них эффекторными клетками, либо с линиями макрофагов (например, линией U937); в этих случаях клетки должны быть дифференцированы в одноядерные [26].

Результаты, полученные с использованием донорской крови и ее фракций как источника эффекторных клеток, с одной стороны, отражают механизмы действия Fc-домена антител на уровне изменения фенотипа клеток-мишеней и эффекторных клеток по таким оцениваемым параметрам, как, например, изменение уровня пролиферации, выброс проапоптотических факторов и пр. С другой стороны, донорская кровь вносит значимую вариабельность в результаты теста. Как альтернативный вариант, для оценки эффекторных функций антительного участка ИЦ возможно использование репортерных тест-систем (см. ниже).

Активацию NK Fc-фрагментом антительного участка ИЦ в ходе АЗКЦ оценивают, как правило, методом проточной цитометрии по увеличению экспрессии маркеров активации CD69, CD107a [26].

Совместные культуры опухолевых и эффекторных клеток используются для определения **полной биологической активности ИЦ** на основе антител с сохраненными эффекторными функциями, поскольку содержат мишени как для антительного, так и для цитокинового участков ИЦ. Полный биологический эффект ИЦ на основе антител с эффекторными функциями может быть результатом аддитивности и/или синергии эффектов всех отдельных заложенных в дизайне механизмов действия антительного и цитокинового участков. В общем случае в итоге совместного культивирования опухолевых и эффекторных клеток оценивают следующие параметры (табл. 1):

- цитотоксичность в отношении опухолевых клеток-мишеней;
- активацию эффекторных клеток;
- пролиферацию эффекторных клеток;
- профиль экспрессируемых в супернатант цитокинов/хемокинов.

В зависимости от ожидаемой функции цитокина на совместных культурах также проводят дополнительные тесты. Например, для ИЦ с IFN- α оценивают созревание дендритных клеток, активацию CD8⁺-Т-клеток за счет зрелых дендритных клеток [29].

Репортерные клеточные системы

Репортерные клеточные линии применяются для оценки связывающей активности различных белковых молекул. Использование таких систем основано на способности исследуемых белковых молекул

запускать внутриклеточные сигнальные каскады с участием транскрипционных факторов вследствие взаимодействия данных белковых молекул с рецептором на внешней мембране клетки.

Традиционно такие клеточные линии получают следующим способом. Репортерная экспрессионная конструкция, содержащая репортерный ген под контролем минимального промотора и сайта связывания для транскрипционного фактора, путем трансфекции вводится в клетку-хозяин и случайным образом встраивается в ее геном. В том случае, если взаимодействие клетки-хозяина с функциональной белковой молекулой приводит к активации транскрипционного фактора (срабатывает механизм действия данной белковой молекулы на уровне активации сигнальных путей), наблюдается экспрессия репортерного гена — как правило, флуоресцентного белка или фермента, — которая далее количественно оценивается.

Так, для оценки АЗФ антительного участка ИЦ возможно использование репортерной системы на основе Т-клеток Jurkat, экспрессирующих рецептор Fc γ RIIA и содержащих NFAT-зависимый промотор, направляющий транскрипцию гена люциферазы, активность которой далее измеряется. Аналогичные репортерные системы получены для оценки способности Fc-фрагмента антительного участка активировать NK, в этом случае модифицированная линия Т-клеток Jurkat экспрессирует на поверхностной мембране рецептор Fc γ RIIA [30].

Возможен вариант конструирования репортерных систем, когда репортерный ген находится под контролем эндогенного промотора, — более физиологически релевантный в плане сохранения клеточных сигнальных путей. В работе J. Liu и соавт. [31] описан вариант замены одного аллеля гена *IL-2* в клеточной линии Jurkat геном люциферазы светлячков с помощью технологии CRISPR-Cas9.

В настоящее время интерес вызывает создание универсальных репортерных систем, позволяющих определять биологическую активность потенциальных терапевтических иммуномодулирующих белков различных классов (цитокинов, хемокинов, агонистов толл-подобных рецепторов и др.), а также их конъюгатов с антителами и полимерами. Использование таких репортерных систем могло бы сократить количество времени и средств, требующихся для определения биологической активности отдельно взятого иммуномодулирующего белка, а также дать возможность сравнительной характеристики изучаемых иммуномодуляторов и их модифицированных вариантов, в частности ИЦ на основе одинаковых антительных участков с различными цитокиновыми участками.

Две люциферазные репортерные системы такого типа были разработаны группой исследователей

Таблица 1. Методы оценки биологической активности отдельных участков ИЦ и целого ИЦ в условиях *in vitro* на целевых и совместных культурах
Table 1. Methods for assessing the biological activity of individual sites of IC and the entire IC under *in vitro* conditions on target cultures and co-cultures

Функционально активная часть ИЦ Functionally active site of the IC	Целевая культура (монослойная/трехмерная) Target culture (monolayer/3D)		Совместная культура (адгезионная/суспензионная) Co-culture (adhesive/suspension)	
	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods
Вариабельный домен Variable region	Блокировка рецептора Receptor blocking	Оценка жизнеспособности клеток-мишеней (общепринятые методы): • витальные красители; • тест на метаболическую активность (определение уровня внутриклеточного аденозинтрифосфата); • тест на выделение внутриклеточного белка (лактадегидрогеназы) Assessment of target cell viability (common methods): • vital dyes; • metabolic activity assay (adenosine triphosphate assay); • intracellular protein release assay (lactate dehydrogenase assay)	—	—
Fc-домен Fc-domain	—	—	Эффекторные функции: КЗЦ, АЗКЦ, АЗФ Effector functions: CDC, ADCC, ADCP	Детекция апоптоза клеток-мишеней; оценка жизнеспособности клеток-мишеней: • общепринятые методы; • метод ЭИС Detection of target cells apoptosis; target cell viability assessment: • generally accepted methods; • EIS method
Цитокин Cytokine	Прямая цитотоксичность Direct cytotoxicity	Оценка жизнеспособности клеток-мишеней; детекция апоптоза клеток-мишеней: • активация каспаз 3/7; • изменения мембраны; • метод ЭИС Assessment of target cells viability; detection of target cells apoptosis: • caspase 3/7 activation; • membrane changes; • EIS method	Активация NK NK activation	Определение экспрессии маркеров активации CD69, CD107a методом проточной цитометрии Determination of expression of activation markers CD69, CD107a by flow cytometry

Окончание табл. 1
End of table 1

Функционально активная часть ИЦ Functionally active site of the IC	Целевая культура (монослойная/трехмерная) Target culture (monolayer/3D)		Совместная культура (адгезионная/суспензионная) Co-culture (adhesive/suspension)	
	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods
Цитокин Cytokine	Индукция экспрессии МНС I и II типа Induction of MHC type I and II expression	Определение экспрессии МНС I и II типа методом проточной цитометрии Determination of MHC type I and II expression by flow cytometry	—	—
	Индукция выработки других цитокинов Induction of other cytokines	Определение профиля вырабатываемых цитокинов методом мультиплексного ИФА Determination of the produced cytokines profile by multiplex ELISA		
	Индукция активации и пролиферации эффекторных клеток Induction of effector cells activation and proliferation	Определение экспрессии маркеров активации, пролиферации методом проточной цитометрии Determination of the activation and proliferation markers expression by flow cytometry		
	Подавление ангиогенеза (интерферон α , трехмерная культура): подавление пролиферации, миграции, инвазии и образования сосудов Inhibition of angiogenesis (interferon α , 3D culture): inhibition of proliferation, migration, invasion and vascularization	Мониторинг миграции и состояния клеточ-мишеней (трехмерная культура) методом микроскопии Monitoring of migration and target cells state (3D culture) by microscopy		
Целый ИЦ Entire IC	—	—	Полная биологическая активность: элиминация клеточ-мишеней, индукция пролиферации и активации эффекторных клеток Complete biological activity: elimination of target cells, induction of effector cells proliferation and activation	См. методы детекции для оценки биологической активности Fe-домена и цитокина на целевых и совместных культурах See detection methods for assessing the biological activity of Fe-domain and cytokine on target cultures and co-cultures

Примечание. ИЦ — иммуноцитотоксин; КЗЦ — комплексная цитотоксичность; АЗКЦ — антителозависимая цитотоксичность; АЗФ — антителозависимый фагоцитоз; ЭИС — электрохимическая импедансная спектроскопия; МНС — молекула главного комплекса гистосовместимости; ИФА — иммуноферментный анализ.
Note. IC — immunocytotoxic; CDC — complement-dependent cytotoxicity; ADCC — antibody-dependent cell cytotoxicity; ADCP — antibody-dependent cellular phagocytosis; EIS — electrochemical impedance spectroscopy; MHC — major histocompatibility complex molecule; ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay.

под руководством D. Neri [32] на основе культур мышиных Т- и В-клеток (линии CTTL-2 и A20 соответственно), в которых репортерный ген люциферазы находится под контролем NF- κ B-RE-элемента. При разработке данных репортерных систем авторы исходили из факта, что многие сигнальные пути, активируемые цитокинами, напрямую либо косвенно приводят к активации NF- κ B; как следствие, полученная репортерная система на основе иммунных клеток, экспрессирующих на поверхности ряд иммунологически важных рецепторов, потенциально позволяет количественно характеризовать различные иммуномодуляторы. Полученные с помощью новых репортерных систем данные о биологической активности цитокиновых участков нескольких ИЦ, разработанных ранее группой под руководством D. Neri (L19-IL-2, F8-TNF, L19-IL-12), оказались сравнимыми с данными, полученными с помощью традиционных монослойных клеточных культур. Помимо этого, разработанные репортерные системы позволили авторам обнаружить новую стратегию потенцирования действия цитокинов — за счет антителозависимого образования кластеров из мультимерных цитокинов (в рассматриваемом случае — членов суперсемейства TNF) на компонентах опухолеассоциированного внеклеточного матрикса.

Репортерные тест-системы отражают механизм действия исследуемого белка на уровне активации сигнальных путей и позволяют исключить вариабельность в результатах, обусловленную изменчивостью природного источника эффекторных клеток — донорской крови и ее фракций, а также снизить затраты времени и труда на проведение самого анализа [30]. Несмотря на данные преимущества, в настоящий момент большая часть исследований осуществляется на стандартных линиях или клетках, выделенных из крови доноров, однако репортерные тест-системы могут заменить данные стандартные подходы в будущем.

Тест-системы на основе 3D-моделей опухолей

Как было указано выше, ИЦ являются мультифункциональными молекулами, в полный биологический эффект которых могут вносить вклад эффекты всех отдельных механизмов действия антительного и цитокинового участков. Для адекватной характеристики в условиях *in vitro* таких молекул клеточная тест-система должна воспроизводить сложное микроокружение и свойства опухоли человека и содержать мишени для антительного и цитокинового участков ИЦ.

Таким требованиям отвечают 3D-модели опухолей [33]. Так, они способны воспроизвести 3D-культуру гетерогенных опухолевых клеток в сложном микро-

окружении из клеточных (фибробласты, эндотелиальные, иммунные и другие типы клеток) и неклеточных (различные сигнальные молекулы, секретируемые клетками опухоли и ее микроокружения: факторы роста, цитокины, хемокины и др.) компонентов, внеклеточного матрикса (совокупность фибронектинов, коллагена, протеогликанов, гликопротеинов и др.).

Помимо этого, 3D-модели опухолей на основе микрофлюидных устройств способны достаточно точно воссоздавать состояние перфузии и сопутствующие механические напряжения, присутствующие в тканях, в зависимости от типа моделируемого рака. В случае сложных систем по типу «тело-на-чипе», «орган-с-опухолью-на-чипе» [34, 35] возможны исследования фармакокинетики, фармакодинамики и безопасности кандидатных противоопухолевых препаратов, в частности ИЦ с сохраненной связывающей активностью FcRn.

Типы 3D-моделей опухолей и способы их получения подробно описаны ранее [33]. Следует отметить, что 3D-клеточные культуры имеют большой потенциал заменить монослойные культуры в качестве платформы для скрининга потенциальных противоопухолевых соединений, в том числе ИЦ. На данный момент существуют коммерческие предложения реактивов, расходных материалов для получения и работы с 3D-клеточными культурами. Также доступны протоколы, методы для работы с 3D-культурами и образовательные материалы.

Далее будут рассмотрены некоторые примеры использования 3D-моделей опухолей для изучения биологической активности ИЦ (методы из указанных исследований представлены в табл. 2) и доступные результаты их клинических исследований.

S. Herter и соавт. разработали гетеротипическую сфероидную модель на основе клеток аденокарциномы кишечника и фибробластов [36]. Авторы использовали ИЦ формата IgG-IL-2v, таргетированные к раково-эмбриональному антигену CEA и фибробластактивирующему белку FAP: анти-CEA-IL-2v и анти-FAP-IL-2v [15, 16], а также биспецифические антитела анти-CD3 ϵ –анти-CEA и анти-CD3 ϵ –анти-FAP. В качестве источника иммунных клеток использовали мононуклеары периферической крови доноров. В работе исследовали таргетирование ИЦ и биспецифических антител к соответствующим областям гетеросфероидов, а также инфильтрацию, активацию и цитотоксичность иммунных клеток в ответ на указанные иммунотерапевтические препараты.

Были показаны специфичное связывание ИЦ анти-CEA-IL-2v и анти-FAP-IL-2v с опухолевыми клетками и фибробластами в гетеросфероиде соответственно, инфильтрация иммунных клеток в гетеросфероид и избирательное элиминирование

Таблица 2. Методы оценки биологической активности отдельных участков ИЦ и целого ИЦ в условиях in vitro на трехмерных моделях опухолей
Table 2. Methods for assessing the biological activity of individual sites of IC and the entire IC in vitro on 3D tumor models

Функционально активная часть ИЦ Functionally active site of the IC	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods
Вариабельный домен Variable domain	Таргетирование ИЦ к опухолевым клеткам Targeting IC to tumor cells	- Мониторинг миграции флуоресцентно меченного ИЦ и его взаимодействия с клетками-мишенями и эффекторными клетками методом оптической микроскопии (микрофлюидная модель, сфероиды); - иммуногистохимический анализ миграции флуоресцентно меченного ИЦ (сфероиды) - Monitoring of the fluorescently labeled IC migration and its interaction with target cells and effector cells by optical microscopy (microfluidic model, spheroids); - immunohistochemical analysis of the fluorescently labeled IC migration (spheroids)
	Элиминация опухолевых клеток Elimination of tumor cells	Анализ жизнеспособности сфероидов с помощью колориметрических тестов и оптической микроскопии Viability analysis of spheroids using colorimetric tests and optical microscopy
	Миграция эффекторных клеток к опухолевым клеткам (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ -Т-клеток) Migration of effector cells to tumor cells (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T cells)	- Мониторинг миграции флуоресцентно меченных эффекторных клеток (определенного типа) и их взаимодействия со сфероидами методом микроскопии (микрофлюидная модель, сфероиды); - иммуногистохимический анализ миграции эффекторных клеток (сфероиды) - Monitoring of fluorescently labeled effector cells migration (certain type) and their interaction with spheroids by microscopy (microfluidic model, spheroids); - immunohistochemical analysis of effector cell migration (spheroids)
Вариабельный домен, Fc-домен, цитокин Variable domain, Fc domain, cytokine	Активация и пролиферация эффекторных клеток (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ -Т-клеток) Activation and proliferation of effector cells (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T cells)	- Оценка пролиферации флуоресцентно меченных эффекторных клеток (определенного типа) методом проточной цитометрии; - оценка активации эффекторных клеток (определенного типа) методом проточной цитометрии по маркерам активации - Assessment of the fluorescently labeled effector cells proliferation (certain type) by flow cytometry; - assessment of the activation of effector cells (certain type) by flow cytometry using activation markers
	Секреция цитокинов/хемокинов Cytokines/chemokines Secretion	- Определение профиля вырабатываемых цитокинов и хемокинов методом мультиплексной проточной цитометрии; - определение профиля вырабатываемых цитокинов и хемокинов методом мультиплексного ИФА; - определение профиля экспрессии генов цитокинов, хемокинов, хемокиновых рецепторов методом ПЦР в реальном времени - Determination of the produced cytokines and chemokines profile by the method of multiplex flow cytometry; - Determination of the produced cytokines and chemokines profile by multiplex ELISA; - determination of the gene expression profile of cytokines, chemokines, chemokine receptors by real-time PCR

Примечание. ИЦ – иммуноцитотоксин; ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Note. IC – immunocytocine; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; PCR – polymerase chain reaction.

соответствующими ИЦ IgG-IL-2v и биспецифическими антителами опухолевых клеток и фибробластов вследствие активации иммунных клеток (Т-, NK-, NKT-клеток). В целом повышенная инфильтрация иммунных клеток в гетеросфероид, их активация, секреция цитокинов и более быстрое элиминирование клеток-мишеней наблюдались при комбинированном использовании IgG-IL-2v и биспецифических антител.

Иммуноцитокينات анти-CEA-IL-2v и анти-FAP-IL-2v лишены эффекторных функций антительного участка (кроме связывания с FcRn) и имеют повышенную аффинность к соответствующим антигенам. Также IL-2v селективно связывается с гетеродимерным среднеаффинным рецептором IL-2R $\beta\gamma$ и не способен связываться с CD25 на регуляторных Т-клетках. Данная модификация направлена на снижение токсичности IL-2.

В I фазе клинических исследований анти-FAP-IL-2v показал умеренную токсичность, способность активировать NK и CD8⁺-Т-клетки в периферической крови, а также проявил терапевтическую активность в виде монотерапии [37], что согласуется с результатами эффективности анти-FAP-IL-2v, полученными на модели опухолевых сфероидов.

Анти-CEA-IL-2v показал высокую противоопухолевую эффективность в доклинических исследованиях, однако во II фазе клинических исследований не проявил достаточную терапевтическую эффективность в виде монотерапии и в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунитета. Его клинические исследования были прекращены по решению спонсора [15].

J.M. Ayuso и соавт. разработали микрофлюидную модель по типу «орган-на-чипе» [38] для изучения иммунотерапевтических препаратов, направленных на активацию и рекрутирование NK-клеток к опухоли и последующую АЗКЦ.

В данной работе клетки рака молочной железы (MCF-7) выращивали в виде сфероидов и помещали в коллагеновый гидрогель. Фланкирующие латеральные полости заселяли эндотелиальными клетками, далее через них пропускали культуральную среду для имитации кровеносных сосудов. NK отдельно либо совместно с ИЦ на основе полноразмерного антитела на основе IL-2, таргетированного к молекуле клеточной адгезии ЕpСAM (анти-ЕpСAM-IL-2), включали в модель, чтобы изучить миграцию NK (в том числе через полученный барьер из эндотелиальных клеток), их цитотоксичность, в случае использования ИЦ – АЗКЦ в 3D-пространстве.

По наблюдениям авторов, проникновению ИЦ в сфероид препятствовали межклеточные контакты, кроме того, опухолевые клетки оказались способны захватывать ИЦ посредством эндоцитоза во внутри-

клеточные липидные везикулы. В то время как клетки NK-92 мигрировали к сфероиду по градиенту хемокинов и проникали в опухоль в течение нескольких часов, АЗКЦ ИЦ не распространялась далее поверхностного слоя сфероида, возможно, из-за ограниченного проникновения ИЦ анти-ЕpСAM-IL-2 в опухоль.

Анти-ЕpСAM-IL-2 является ИЦ на основе IL-2 дикого типа с той же аффинностью к ЕpСAM, что и у исходного антитела. По результатам II фазы клинических исследований анти-ЕpСAM-IL-2 в комбинации с циклофосфамидом [39] проявлял умеренную токсичность, но не показал преимуществ в терапевтическом действии по сравнению с контрольной группой. Возможно, причина недостаточной эффективности анти-ЕpСAM-IL-2 заключалась в его неспособности пройти через межклеточные контакты в опухоль, что стало возможным наблюдать с помощью 3D-модели опухоли.

A. Jaekel и соавт. использовали совместную культуру сфероидов рака молочной железы MCF-7 и одноклеточных клеток периферической крови для оценки способности к инфильтрации нового ИЦ на основе IL-15 и полноразмерного антитела к опухолеассоциированному гликозилированному эпигликану MUC1 [40]. Было показано, что ИЦ GT-00A x IL15, в противоположность исходному антителу GT-00A, индуцирует инфильтрацию CD8⁺-Т-клеток внутрь сфероидов, а также способствует уменьшению размера сфероидов.

По результатам доклинических исследований на нескольких мышинных моделях GT-00A x IL15 показал эффективность в качестве монотерапии.

Заключение

В настоящем обзоре были рассмотрены существующие подходы к характеристике биологической активности ИЦ в условиях *in vitro* в ходе доклинических исследований.

Выбор методов для оценки биологической активности ИЦ в условиях *in vitro* будет определяться используемыми в дизайне функциями антительного и цитокинового участков.

- Для подтверждения используемого в дизайне ИЦ механизма действия его отдельных участков достаточно работы с монослойными культурами.
- Несмотря на время- и трудозатратность, тест-системы «золотого стандарта» для определения специфической биологической активности цитокина(ов) и эффекторных функций антительного участка используются в подавляющем большинстве исследований новых вариантов ИЦ.
- Коммерческие репортерные клеточные системы остаются альтернативным вариантом оценки заложенной в дизайне биологической активности

цитокинового и антительного участков на уровне активации сигнальных путей. В настоящее время представляют интерес и разрабатываются «универсальные» репортерные системы, позволяющие количественно охарактеризовать ИЦ с различными цитокиновыми участками и их вариантами на одной репортерной клеточной линии.

- Совместные культуры опухолевых и эффекторных клеток позволяют оценить цитотоксический и иммуномодулирующий эффекты антительного и цитокинового участков без использования методов 3D-культивирования.
- Использование 3D-моделей опухолей позволяет заменить несколько тестов на биологическую активность отдельных участков ИЦ, проводимых на монокультурах и совместных культурах, на одно комплексное исследование. Это дает возможность оценить противоопухолевую активность ИЦ в условиях, более приближенных к реальным: его способность проникать в ткани и элиминировать опухолевые клетки за счет цитотоксичности и активации иммунных клеток. Недостатком такого подхода являются значительные временные и материальные затраты.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Berraondo P., Sanmamed M.F., Ochoa M.C. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2019;120(1):6–15. DOI: 10.1038/s41416-018-0328-y
- Conlon K.C., Miljkovic M.D., Waldmann T.A. Cytokines in the treatment of cancer. *J Interferon Cytokine Res* 2019;39(1):6–21. DOI: 10.1089/jir.2018.0019
- Hutmacher C., Neri D. Antibody-cytokine fusion proteins: biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;141:67–91. DOI: 10.1016/j.addr.2018.09.002
- Collins S., Joshi A., Shen L. et al. 357 TAK-573, an anti-CD38-attenuated interferon alpha (IFN α) fusion protein (AttenukineTM), has demonstrated IFN α receptor (IFNAR) pathway modulation in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *J Immunother Cancer* 2020;8:Suppl 3. DOI: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0357
- Runbeck E., Crescioli S., Karagiannis S.N., Papa S. Utilizing immunocytokines for cancer therapy. *Antibodies (Basel)* 2021;10(1):10. DOI: 10.3390/antib10010010
- Kaufman H.L., Mehnert J.M., Cuillerot J.-M. et al. Targeted modified IL-2 (NHS-IL2, MSB0010445) combined with stereotactic body radiation in advanced melanoma patients after progression on ipilimumab: assessment of safety, clinical, and biologic activity in a phase 2a study. *J Clin Oncol* 2014;32(15 suppl):TPS9107. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.tps9107
- Overgaard N.H., Fan T.M., Schachtschneider K.M. et al. Of mice, dogs, pigs, and men: choosing the appropriate model for immuno-oncology research. *ILAR J* 2018;59(3):247–62. DOI: 10.1093/ilar/ily014
- Neri D. Antibody-cytokine fusions: versatile products for the modulation of anticancer immunity. *Cancer Immunol Res* 2019;7(3):348–54. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0622
- Young P.A., Morrison S.L., Timmerman J.M. Antibody-cytokine fusion proteins for treatment of cancer: engineering cytokines for improved efficacy and safety. *Semin Oncol* 2014;41(5):623–36. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2014.08.002
- Gillies S.D., Lan Y., Lo K.M. et al. Improving the efficacy of antibody-interleukin 2 fusion proteins by reducing their interaction with Fc receptors. *Cancer Res* 1999;59(9):2159–66.
- Wahab S., Hussain A. Cytokines as targets for immunomodulation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:60–4.
- Zou G.M., Tam Y.K. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002;13(2):186–99.
- Gillies S.D., Lan Y., Hettmann T. et al. A low-toxicity IL-2-based immunocytokine retains antitumor activity despite its high degree of IL-2 receptor selectivity. *Clin Cancer Res* 2011;17(11):3673–85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2921
- Pogue S.L., Taura T., Bi M. et al. Targeting attenuated interferon- α to myeloma cells with a CD38 antibody induces potent tumor regression with reduced off-target activity. *PLoS ONE* 2016;11(9):e0162472. DOI: 10.1371/journal.pone.0162472
- Klein C., Waldhauer I., Nicolini V.G. et al. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncimmunology* 2017;6(3):e1277306 DOI: 10.1080/2162402x.2016.1277306
- Klein C., Inja W., Nicolini V. et al. Abstract PR8: Novel tumor-targeted, engineered IL-2 variant (IL-2v)-based immunocytokines for immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 2013;73:PR8.
- Hemmerle T., Neri D. The dose-dependent tumor targeting of antibody-IFN γ fusion proteins reveals an unexpected receptor-trapping mechanism *in vivo*. *Cancer Immunol Res* 2014;2(6):559–67. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-13-0182
- Kaspar M., Trachsel E., Neri D. The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2007;67(10):4940–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0283
- Tzeng A., Kwan B.H., Opel C.F. et al. Antigen specificity can be irrelevant to immunocytokine efficacy and biodistribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(11):3320–5. DOI: 10.1073/pnas.1416159112
- Gillies S.D. A new platform for constructing antibody-cytokine fusion proteins (immunocytokines) with improved biological properties and adaptable cytokine activity. *Protein Eng Des Sel* 2013;26(10):561–9. DOI: 10.1093/protein/gzt045
- Mock J., Stringhini M., Villa A. et al. An engineered 4-1BBL fusion protein with “activity on demand”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(50):31780–8. DOI: 10.1073/pnas.2013615117
- Venet D., Koovely D., Weder B., Neri D. Targeted reconstitution of cytokine activity upon antigen binding using split cytokine antibody fusion proteins. *J Biol Chem* 2016;291(35):18139–47. DOI: 10.1074/jbc.M116.737734
- Кособокова Е.Н., Шешукова Е.В., Пинюгина М.В. и др. Разработка технологии получения слитного белка на основе моноклонального гуманизированного антитела против опухолевого антигена HER2 и интерферона- α -2b человека из *Nicotiana benthamiana*. *Биотехнология* 2019;35(2):49–57. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57
- Kosobokova E.N., Sheshukova E.V., Pinyugina M.V. et al.

- Development of technology for producing of fusion protein based on humanized monoclonal antibody to tumor HER2 antigen and recombinant human interferon- α -2b in *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnologiya = Biotechnology* 2019;35(2):49–57. (In Russ.). DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57
24. Mire-Sluis A.R., Page L., Thorpe R. Quantitative cell line based bioassays for human cytokines. *J Immunol Methods* 1995;187(2):191–9. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00220-1
 25. Dakhel S., Lizak C., Matasci M. et al. An attenuated targeted-TNF localizes to tumors *in vivo* and regains activity at the site of disease. *Int J Mol Sci* 2021;22(18):10020. DOI: 10.3390/ijms221810020
 26. Jiang X.R., Song A., Bergelson S. et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(2):101–10. DOI: 10.1038/nrd3365
 27. Fenerty K.E., Padgett M., Wolfson B. et al. Immunotherapy utilizing the combination of natural killer- and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)-mediating agents with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition. *J Immunother Cancer* 2018;6(1): 133. DOI: 10.1186/s40425-018-0445-4
 28. Xi B., Ye P.F., Golubovskaya V., Abassi Y. *In vitro* functional assay using real-time cell analysis for assessing cancer immunotherapeutic agents. In: *Immuno-oncology. Cellular and translational approaches*. Ed. by S.L. Tan. Humana, N.Y., 2020. P. 35–50. DOI: 10.1007/978-1-0716-0171-6_3
 29. Li Z., Zhu Y., Li C. et al. Anti-VEGFR2-interferon- α 2 regulates the tumor microenvironment and exhibits potent antitumor efficacy against colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2017;6(3):e1290038. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1290038
 30. Wang L., Yu C., Wang J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv* 2020;39:107466. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107466
 31. Liu J., Liu R., Gray P. et al. Development of a luciferase reporter Jurkat cell line under the control of endogenous interleukin-2 promoter. *J Immunol Methods* 2017;451:48–53. DOI: 10.1016/j.jim.2017.08.006
 32. Mock J., Pellegrino C., Neri D. A universal reporter cell line for bioactivity evaluation of engineered cytokine products. *Sci Rep* 2020;10(1):3234. DOI: 10.1038/s41598-020-60182-4
 33. Brancato V., Oliveira J.M., Corrello V.M. et al. Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials* 2020;232:119744. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119744
 34. Bregenzer M.E., Horst E.N., Mehta P. et al. Integrated cancer tissue engineering models for precision medicine. *PLoS ONE* 2019;14(5):e0216564. DOI: 10.1371/journal.pone.0216564
 35. Dhiman N., Kingshott P., Sumer H. et al. On-chip anticancer drug screening – recent progress in microfluidic platforms to address challenges in chemotherapy. *Biosens Bioelectron* 2019;137:236–54. DOI: 10.1016/j.bios.2019.02.070
 36. Herter S., Morra L., Schlenker R. et al. A novel three-dimensional heterotypic spheroid model for the assessment of the activity of cancer immunotherapy agents. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66(1):129–40. DOI: 10.1007/s00262-016-1927-1
 37. Soerensen M.M., Ros W., Rodriguez-Ruiz M.E. et al. Safety, PK/PD, and anti-tumor activity of RO6874281, an engineered variant of interleukin-2 (IL-2v) targeted to tumor-associated fibroblasts via binding to fibroblast activation protein (FAP). *J Clin Oncol* 2018;36(15 suppl):e15155. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e15155
 38. Ayuso J.M., Truttschel R., Gong M.M. et al. Evaluating natural killer cell cytotoxicity against solid tumors using a microfluidic model. *Oncoimmunology* 2019;8(3):1553477. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1553477
 39. Gladkov O., Biakhov M., Ramlau R. et al. Phase II trial of huKS-IL2 with cyclophosphamide (CTX) in patients with extensive disease small-cell lung cancer (ED-SCLC). *J Clin Oncol* 2012;30(15 Suppl):7090. DOI: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.7090
 40. Jaekel A., Kehler P., Lischke T. et al. Preclinical characterization of GT-00A x IL15: a novel IL-15-based immunocytokine with unique tumor targeting properties. *J Immunother Cancer* 2021;9(Suppl 2):A741. DOI: 10.1136/jitc-2021-SITC2021.712

Вклад авторов

К.М. Коноплина: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;
Е.Н. Кособокова: сбор и анализ данных литературы, разработка дизайна обзора;
В.С. Косоруков: экспертный анализ текста.

Authors contributions

K.M. Konoplina: collection and analysis of literature data, article written;
E.N. Kosobokova: collection and analysis of literature data, design of the review;
V.S. Kosorukov: final expertise of the article text.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.М. Коноплина / K.M. Konoplina: <https://orcid.org/0000-0003-0130-2628>
Е.Н. Кособокова / E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1060.

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement № 075-15-2021-1060.

Статья поступила: 25.04.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.

Article submitted: 25.04.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.