

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**ПИЛУНОВ АРТЕМ МИХАЙЛОВИЧ**

**Трансгенные Т-лимфоциты, специфичные к минорным  
антигенам гистосовместимости АСС-1У и НА-1**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории трансплантационной иммунологии Национального медицинского исследовательского центра гематологии Минздрава России.

**Научный руководитель**                      **Григорий Александрович Ефимов**  
кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты**

**Лебедев Юрий Борисович**  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории  
сравнительной и функциональной геномики, отдела  
геномики адаптивного иммунитета, ФГБУН  
Государственный научный центр Российской  
Федерации Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

**Боженко Владимир Константинович**  
доктор медицинских наук, профессор,  
заслуженный врач РФ, заведующий отделом  
молекулярной биологии и экспериментальной  
терапии опухолей ФГБУ Российский научный центр  
рентгенорадиологии МЗ РФ

**Табаков Дмитрий Вячеславович**  
кандидат медицинских наук, исследователь лаборатории  
мультиомики Центра живых систем ФГАОУ ВО  
"Московский физико-технический институт  
(Национальный Исследовательский Университет)"

Защита диссертации состоится «6» декабря 2024 г. в 17 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: г . Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3223>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.  
Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат  
биологических наук                      Д.Б. Киселевский



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является золотым стандартом терапии острых миелоидных (ОМЛ) и лимфобластных (ОЛЛ) лейкозов. Тем не менее, рецидив злокачественного заболевания после алло-ТГСК развивается приблизительно у половины пациентов, что делает крайне актуальной разработку методов терапии рецидивов. Терапия методом adoptивного переноса Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) показала высокую эффективность при лечении В-клеточных лейкозов, однако не может быть столь же успешно применена при лейкозах миелоидного происхождения. Это объясняется тем, что многие поверхностные антигены клеток миелоидного ряда присутствуют также на клетках миелоидных предшественников, и потому уничтожение клеток с таким поверхностным антигеном неизбежно приведет к серьезным нарушениям кроветворения. В таком случае необходим более избирательный подход к поиску мишеней иммунотерапии. Перспективной мишенью для терапии лейкозов являются минорные антигены гистосовместимости (МАГ) – презентруемые в контексте молекул HLA пептиды, различающиеся у донора и реципиента из-за генетического полиморфизма. Один из наиболее многообещающих методов терапии и профилактики рецидивов лейкозов состоит в adoptивном переносе донорских CD8<sup>+</sup> Т-клеток, модифицированных трансгенными Т-клеточными рецепторами (ТКР), специфичными к МАГ реципиента, экспрессия которых ограничена клетками крови. При алло-ТГСК от донора, отрицательного по иммуногенному варианту МАГ к реципиенту, имеющему иммуногенный вариант МАГ, трансгенные МАГ-специфичные Т-киллеры способны различать клетки крови донорского и реципиентского происхождения, уничтожая только имеющие МАГ клетки реципиентского происхождения, в том числе клетки злокачественных новообразований крови. Минорные антигены

гистосовместимости HA-1 и АСС-1У происходят из генов *ARHGAP45* и *BCL2A1*, чья экспрессия наиболее высока в клетках крови. Цель этой работы – разработка метода получения генетически модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости HA-1 и АСС-1У.

**Цель этой работы** – разработка метода получения генетически модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости HA-1 и АСС-1У.

**Нами были поставлены следующие задачи:**

1. Получить Т-клеточный клон, специфичный к МАГ АСС-1У, исследовать цитотоксические свойства этого клона. Показать функциональность трансгенного АСС-1У-специфичного ТКР в CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах.
2. Провести анализ репертуара ТКР в культурах Т-клеток, полученных стимуляцией наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов пептидом HA-1. С помощью репортерной линии J76 выявить функциональные ТКР, распознающие МАГ HA-1, изучить их чувствительность к стимуляции антигеном.
3. Исследовать цитотоксичность CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, модифицированных отобранным HA-1-специфичным ТКР ER28 и подвергшихся CRISPR/Cas нокауту эндогенного ТКР, на образцах периферических мононуклеаров пациентов со злокачественными новообразованиями крови.

**Научная новизна работы**

Научная новизна заключается в следующем: на минорный антиген HA-1 были получены *in vitro* экспансии CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (т.е. популяции лимфоцитов, ответившие пролиферацией на стимуляцию антигенным пептидом HA-1 в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости 1 класса HLA-A\*02), и проведен биоинформатический анализ репертуаров ТКР в этих экспансиях. Показана функциональная активность тринадцати HA-1-специфичных ТКР и одного АСС-1У-специфичного ТКР, ранее не описанных в литературе. Для тринадцати HA-1-

специфичных ТКР проведена оценка аффинности и аллореактивности, на основе этой оценки отобран ТКР ER28, как обладающий наибольшей аффинностью к пептиду HA-1 и не показавший аллореактивности в функциональных тестах. Отобраны две последовательности гайд-РНК, приводящие к наиболее эффективному нокауту ТКР в клеточной линии Jurkat E6-1. Получены CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, имеющие нокаут эндогенного ТКР и модифицированные трансгенным ТКР ER28. Был показан специфический цитотоксический эффект лимфоцитов с трансгенным ТКР ER28 только на клетки, презентующие эндогенный или экзогенный пептид HA-1. Трансгенные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты не проявляли цитотоксичность в отношении клеток без пептида HA-1. Цитотоксический эффект был показан на образцах периферической крови, взятых у пациентов с различными диагнозами: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), Т- и В-клеточные лейкозы.

**Теоретическая и практическая значимость работы:** подтверждено, что минорные антигены гистосовместимости могут быть мишенями иммунотерапии в ряде гематологических заболеваний, таких как ОМЛ, В- и Т-клеточные лейкозы. Отобранный ТКР ER28 обладает достаточной аффинностью, чтобы модифицированные им лимфоциты могли распознавать и уничтожать клетки злокачественных новообразований крови, презентующие эндогенный пептид HA-1, при этом не демонстрируя неспецифичной цитотоксичности в отношении клеток, не имеющих МАГ HA-1. Примененный в работе метод получения и исследования МАГ-специфичных ТКР, основанный на биоинформатическом анализе репертуаров ТКР антиген-специфичных экспансий с последующим клонированием индивидуальных субъединиц ТКР и их исследовании на модели репортерных лимфоцитов, может быть использован для получения и исследования ТКР, специфичных к другим антигенам.

**Объектами исследования** были образцы периферической крови здоровых доноров и пациентов со злокачественными новообразованиями крови, а также человеческие клеточные линии. Все доноры и пациенты дали информированное согласие на проведение исследований. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ НМИЦ Гематологии, протокол № 126, 25.02.2022.

### **Методология и предмет исследования**

Источником репертуаров МАГ-специфичных ТКР служили антиген-специфические *in vitro* экспансии CD8<sup>+</sup> лимфоцитов МАГ-отрицательных здоровых доноров. Высокопроизводительное секвенирование репертуаров ТКР и их бионформатический анализ были выполнены в соответствии с ранее опубликованными протоколами и с помощью программ анализа, находящихся в открытом доступе. Для исследования репертуара НА-1-специфичных ТКР был разработан лентивирусный вектор на основе системы быстрого клонирования Golden Gate. Исследование функциональной активности НА-1-специфичных ТКР проводили на репортерных Т-лимфоцитах J76. В качестве клеток-стимуляторов для экспериментов по исследованию трансгенных НА-1-специфичных ТКР выступали полученные нами клетки линии K562, экспрессирующие трансгенный HLA-A\*02, а также криоконсервированные образцы периферической крови здоровых доноров и пациентов со злокачественными новообразованиями крови. Цитотоксичность трансгенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали на замороженных образцах периферической крови пациентов со злокачественными новообразованиями крови с помощью измерения доли клеток, находящихся в апаптозе методом проточной цитофлуориметрии. Данные глубокого HLA типирования пациентов и доноров предоставлены ФГБУ НМИЦ Гематологии.

### **Достоверность результатов**

Для оценки аффинности ТКР проводили два независимых эксперимента по титрованию, каждая экспериментальная точка была выполнена в двух технических повторностях. Опыты по изучению цитотоксичности лимфоцитов с трансгенным ТКР выполнены на лимфоцитах от двух доноров, каждая экспериментальная точка выполнена в двух технических повторностях. Методы исследования функциональной активности ТКР, а также методы биоинформатического анализа репертуаров ТКР соответствуют международным стандартам.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Метод *in vitro* стимуляции наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов дендритными клетками, презентирующими экзогенный пептид, может использоваться для выявления Т-клеточных клонов, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости. Сравнение репертуаров субъединиц ТКР в антиген-специфичной и антиген-неспецифичной фракциях Т-клеток индивидуальных культур способно выявить субъединицы, потенциально принадлежащие антиген-специфичным ТКР.
2. Проведенные функциональные исследования на линии репортерных клеток и первичных Т-лимфоцитах человека позволили отобрать из панели ТКР рецептор, обладающий наибольшей аффинностью и не проявляющий кроссреактивности на панели образцов с широким набором различных аллелей HLA.
3. Трансгенные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, модифицированные отобранным HA-1-специфичным ТКР, способны специфично уничтожать клетки злокачественных новообразований кроветворной ткани пациентов, позитивных по МАГ HA-1.

### **Личный вклад автора**

В рамках исследования ТКР, специфичного к МАГ АСС-1У, автором был получен лентивирусный конструктор, кодирующий АСС-1У-специфичный ТКР, была проведена работа по оптимизации протокола получения лентивирусных частиц в линии НЕК293Т. Автором были получены трансгенные CD8<sup>+</sup> Т-

лимфоциты, специфичные к МАГ АСС-1У, и исследована их функциональная активность. Первичная культура CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичных к АСС-1У, была получена Анной Кучмий и Савелием Шитиковым. По результатам изучения АСС1У-специфичного ТКР, автором были проанализированы данные и написан текст статьи №4.

В исследовании ТКР, специфичных к НА-1, автором была создана панель лентивирусных конструкторов, кодирующих трансгенные ТКР, получена панель трансгенных репортерных клеточных линий, несущих эти ТКР. Автором был адаптирован протокол CRISPR/Cas модификации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, совмещенной с лентивирусной трансдукцией. Автором были разработаны и проведены эксперименты по изучению функциональной активности и цитотоксичности НА-1-специфичных ТКР, проведен статистический анализ и визуализация данных. Биоинформатический анализ выполнен совместно с Александрой Хмелевской. По результатам изучения НА-1-специфичных ТКР, автором были собраны и проанализированы данные, и написан текст статьи №1.

В рамках теоретического исследования темы диссертации, автором опубликована обзорная статья №3. Автором был создан рисунок и написана часть текста в статье №2. Также автором написан текст настоящей диссертации.

### **Апробация результатов и публикации**

Результаты диссертационной работы были обсуждены и представлены на российских и международных конференциях:

XVI Raisa Gorbacheva memorial meeting. Hematopoietic stem cell transplantation. Gene and cellular therapy, Санкт-Петербург, 2022. Доклад «Трансгенные Т-лимфоциты, специфичные к минорному антигену НА-1, для посттрансплантационной терапии лейкозов».

International Society For Stem&Cell Therapy, электронный постер «Transgenic lymphocytes targeting minor histocompatibility antigens for post-transplant immunotherapy», 2020

International Conference of Lymphocyte Engineering, London, 2019. Hematopoietic Minor Histocompatibility Antigen-specific CD8+ T Cells For Anti-relapse Therapy After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

European Federation of Immunogenetics conference, Venice, 2018. Modification of CD8+ T cells with T cell receptor specific for minor antigen АСС-1Y

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 225 источников. Работа изложена на 136 страницах, содержит 30 рисунков, 7 таблиц и приложение из 1 рисунка и 5 таблиц.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Работа посвящена разработке метода получения генетически модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости НА-1 и АСС-1Y.

Первая часть работы посвящена изучению ТКР, специфичного к минорному антигену АСС-1Y. Во второй части работы описано получение панели ТКР, специфичных к МАГ НА-1, и отбор наиболее перспективного ТКР. С помощью биоинформатического анализа были отобраны субъединицы ТКР, наиболее вероятно принадлежащие НА-1-спзатем следует клонирование отобранных цепей ТКР в лентивирусный вектор. С помощью модели репортерных клеток J76 были выявлены функциональные комбинации цепей ТКР, исследованы их аффинность, кроссреактивность и ответ на клетки крови здоровых доноров и пациентов с лейкозами, положительных и отрицательных по НА-1. Наконец, продемонстрирован цитотоксический ответ CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, модифицированных НА-1-специфичным ТКР лентивирусной

трансдукцией и CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР, на клетки крови пациентов с различными типами лейкозов.

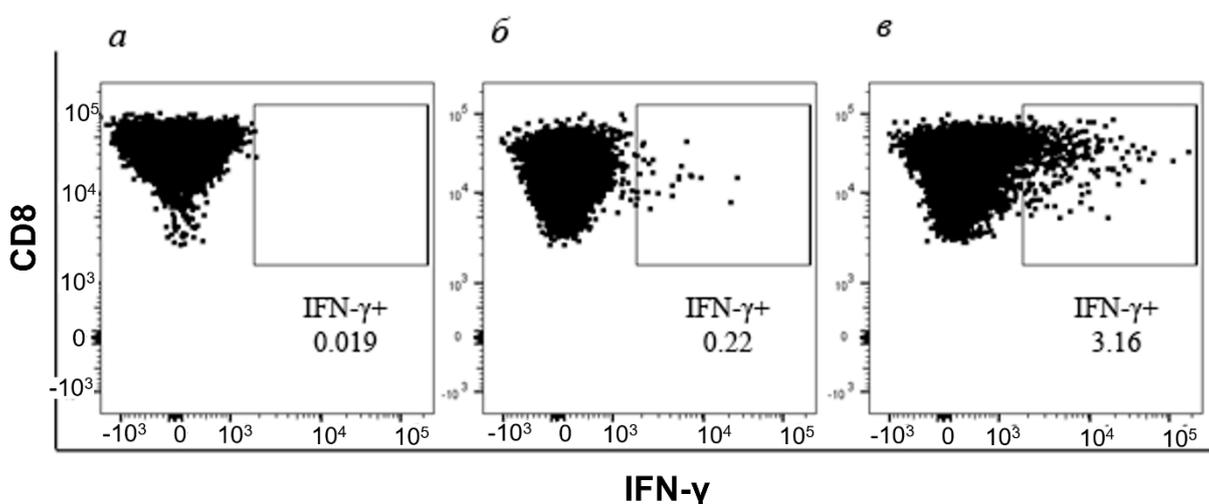
### **CD8<sup>+</sup> Т-клетки, модифицированные специфичным к АСС-1У трансгенным ТКР, секретируют IFN- $\gamma$ при антигенной стимуляции**

Минорный антиген АСС-1У – производное антиапоптотического гена *BCL2A1*, часто сверхэкспрессированного в опухолевых клетках.

Наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки донора, отрицательного по АСС-1У, стимулировали аутологичными дендритными клетками, нагруженными пептидом АСС-У. После стимуляции, наличие в культурах Т-клеточных клонов, специфичных к АСС-У, детектировали окраской тетрамером. Для одной культуры, связавшиеся с тетрамером клетки были обогащены методом иммуномагнитной сепарации, и из обогащенной фракции выделена ДНК. Секвенирование нуклеотидных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц ТКР по Сэнгеру подтвердило присутствие в культуре одного доминантного клона. Нуклеотидные последовательности, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы ТКР, специфичного к АСС-1У, были клонированы в лентивирусный вектор. С помощью программы ImMunoGeneTics были идентифицированы аллели варьируемых генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц данного ТКР: TRAV131\*02 и TRAJ3\*01 для  $\alpha$ -субъединицы и TRBV6-5\*01, TRBD2\*02 и TRBJ1-3\*01 для  $\beta$ -субъединицы.

Лентивирусными частицами, несущими трансгенный ТКР, специфичный к АСС-1У, трансдуцировали CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, полученные из здорового донора с генотипом HLA-A\*24<sup>+</sup> и не имеющего МАГ АСС-1У. При трансдукции брали вирус в соотношении две вирусные частицы на одну клетку. Спустя 48 ч, трансдуцированные клетки стимулировали аутологичными облученными лимфобластами (В-ЛКЛ), презентирующими экзогенный пептид АСС-1У, или клетками без пептида в качестве контроля, стимуляцию проводили 16 ч. Специфический ответ трансдуцированной культуры CD8<sup>+</sup> Т-клеток на пептид АСС-1У был подтвержден методом

внеклеточного окрашивания на интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ) (рис. 1В). Ответ на клетки, не презентующие экзогенного пептида ACC-1Y, не был детектирован (рис.1Б). Из трансдуцированной культуры была выделена ДНК, и методом qPCR было оценено среднее количество интеграций вируса на геном. Соотношение составило около одной стабильной интеграции на 100 клеток. Оценка в несколько процентов модифицированных клеток в популяции согласуется с данными внеклеточной окраски на IFN- $\gamma$ .

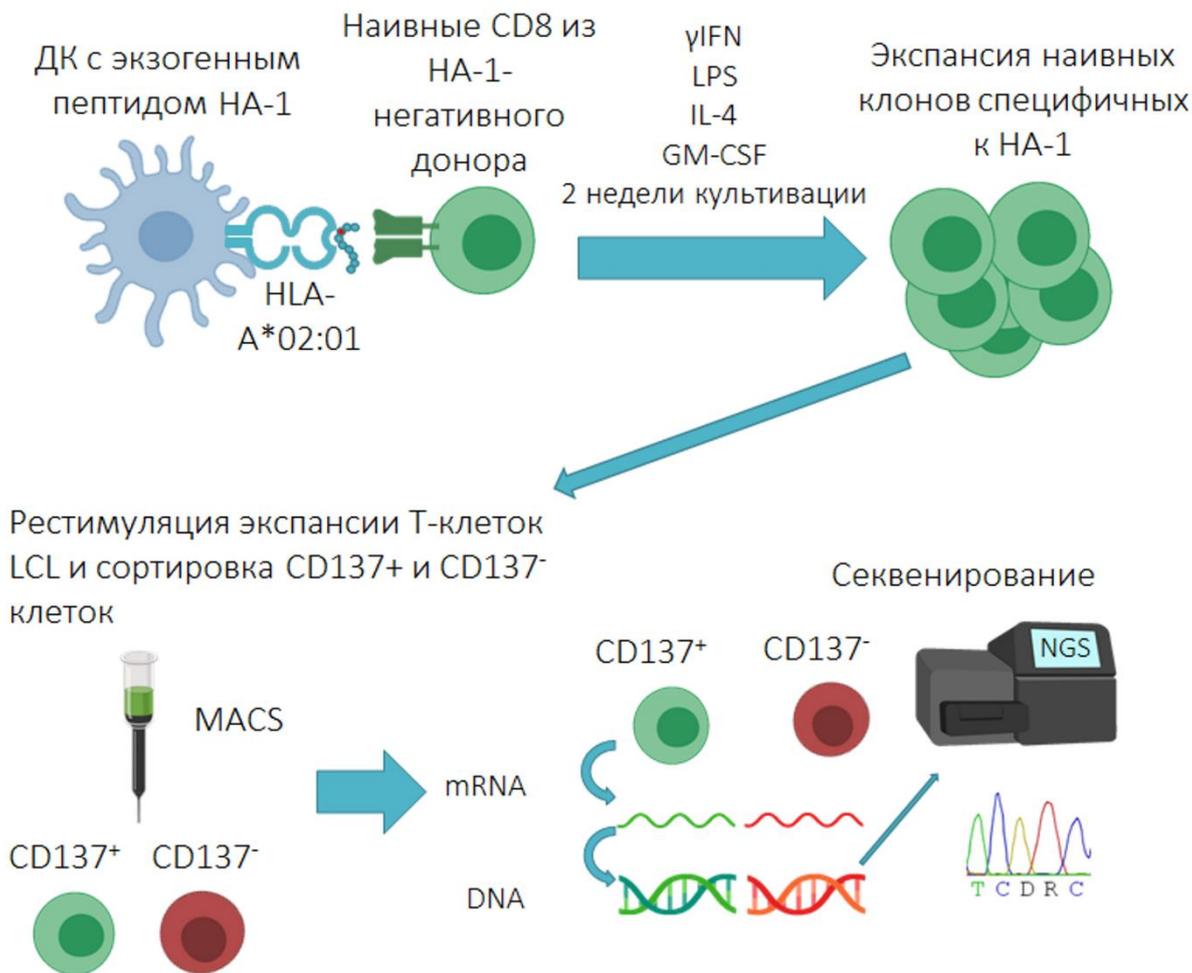


**Рисунок 1. Трансдуцированные Т-клетки секретируют IFN- $\gamma$  в ответ на антигенную стимуляцию. Внеклеточная окраска на IFN- $\gamma$ . а – Неокрашенный контроль. б – Клетки трансдуцированной культуры, инкубированные с В-ЛКЛ без пептида. в – с В-ЛКЛ, нагруженными пептидом ACC1-Y.**

**Биоинформатический анализ репертуара ТКР, специфичных к минорному антигену HA-1, показывает высокую степень уникальности последовательностей CDR3 и большую представленность гена TRBV7-9**

Наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты 5 здоровых доноров, имеющих HLA-A\*02 и отрицательных по HA-1 стимулировали аутологичными дендритными клетками, презентующими экзогенный пептид HA-1, как указано на рисунке 11. При стимуляции клетки рассеивали в количестве  $2 \cdot 10^5$  наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на ячейку 96-ячеечного планшета, культивацию проводили с  $10^5$  аутологичных дендритных клеток. В результате было получено 109 клеточных культур, в 39 из которых клетки окрашивались тетрамером. Аналогичным

образом были простимулированы наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты трех отрицательных по HLA-A\*02 доноров, однако в таком случае использовались ДК от другого донора, имевшего HLA-A\*02. По литературным данным, аллогенная стимуляция позволяет получить высокоаффинные ТКР к антигену.



**Рисунок 2. Схема получения репертуара ТКР специфичных к HA-1 с использованием CD137 как маркера антиген-специфичной фракции.**

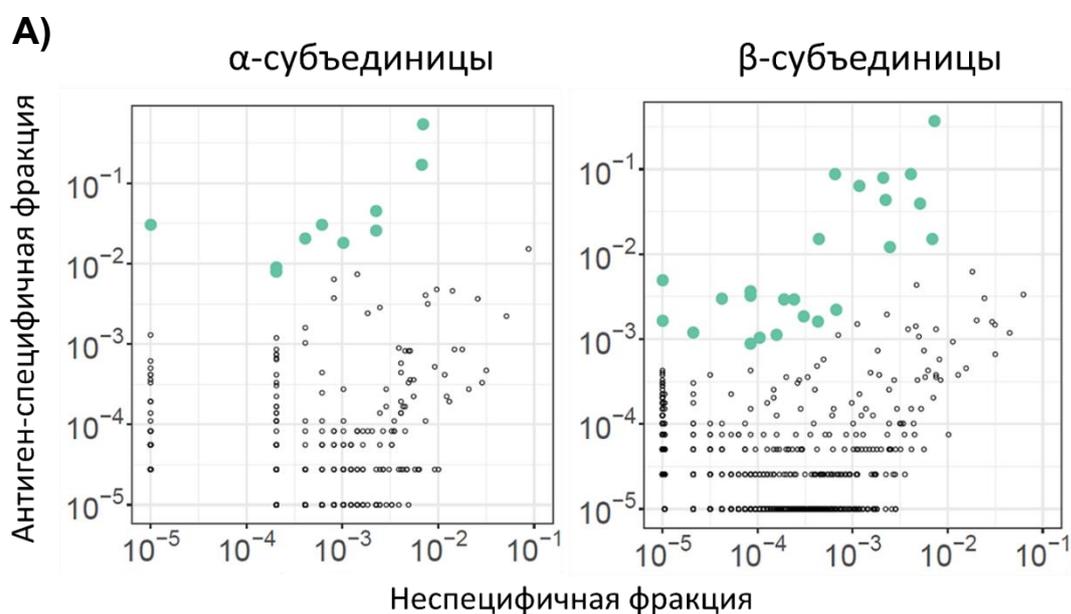
Дендритные клетки презентующие экзогенный пептид HA-1 культивируют в течение 14 дней с аутологичными наивными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами в присутствии цитокинов. После культивации культуры рестимулировали клетками В-ЛКЛ, презентующими экзогенный пептид. Из активировавшейся (CD137<sup>+</sup>) и неактивировавшейся (CD137<sup>-</sup>) фракции клеток выделяли мРНК, синтезировали кДНК и анализировали ТКР методом высокопроизводительного секвенирования. При сепарации антиген-

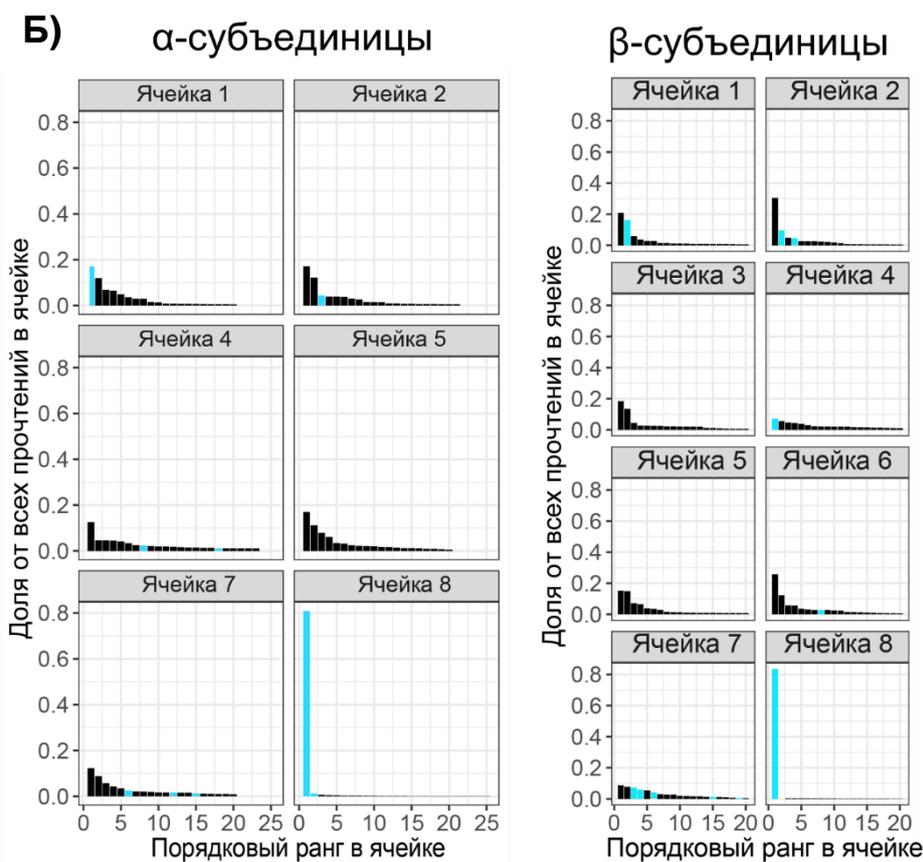
специфичной фракции клеток с помощью тетрамеров использовалась принципиально такая же схема.

Чтобы выявить специфичные к НА-1 клоны, после стимуляции и экспансии культуру CD8<sup>+</sup> Т-клеток из каждой ячейки окрашивали тетрамером HLA-A\*02:01-НА-1. Сортировку антиген-специфической фракции клеток проводили двумя различными методами – рестимуляцией или сортировкой с помощью тетрамера. В первом методе Т-лимфоциты культивировали с клетками В-ЛКЛ, презентирующими экзогенный пептид НА-1. В результате, распознавшие антиген Т-лимфоциты экспрессировали на поверхности маркер активации CD137. Далее магнитной сепарацией культуру разделяли на положительную и отрицательную по экспрессии CD137 фракции. Таким образом были обработаны культуры из доноров р845 и р180. Для доноров р1102 и р005 проводили магнитную сепарацию тетрамер-позитивной фракции.

Из антиген-специфичной и антиген-неспецифичной фракций выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию и секвенировали репертуар ТКР методом высокопроизводительного секвенирования. В каждой культуре считали долю прочтений каждой уникальной нуклеотидной последовательности  $\alpha$  или  $\beta$  субъединиц ТКР в образце из этой культуры (рис. 3). На рис.3А приведен репрезентативный пример для культур из донора р845. Каждая уникальная последовательность субъединицы ТКР представлена точкой, по оси ординат отложена частота прочтений в антиген-специфической фракции, по оси абсцисс - частота прочтений в антиген-неспецифической фракции Т-клеток. Чем ближе значение на осях к единице, тем больше относительная доля прочтений последовательности. Как достоверно обогащенные определялись последовательности, частота которых была минимум в 10 раз больше в антиген-специфической фракции по сравнению с антиген-неспецифической фракцией. Достоверность обогащения должна подтверждаться точным тестом Фишера, с р-значением не более 0,05.

Обогащенные последовательности на графиках обозначены цветом. На рис.3Б, доля последовательностей приведена отдельно для каждой культуры в виде гистограмм, культуры обозначены по нумерации ячеек клеточного планшета. По оси ординат отложена частота каждой последовательности в соответствующей ей культуре, по оси абсцисс – ранг каждой последовательности в соответствии с её частотой. В культуре из ячейки 8 присутствует один доминантный НА-1-специфичный клон, однако в большинстве культур ситуация иная и НА-1-специфичные лимфоциты не являются наиболее представленными в культуре.





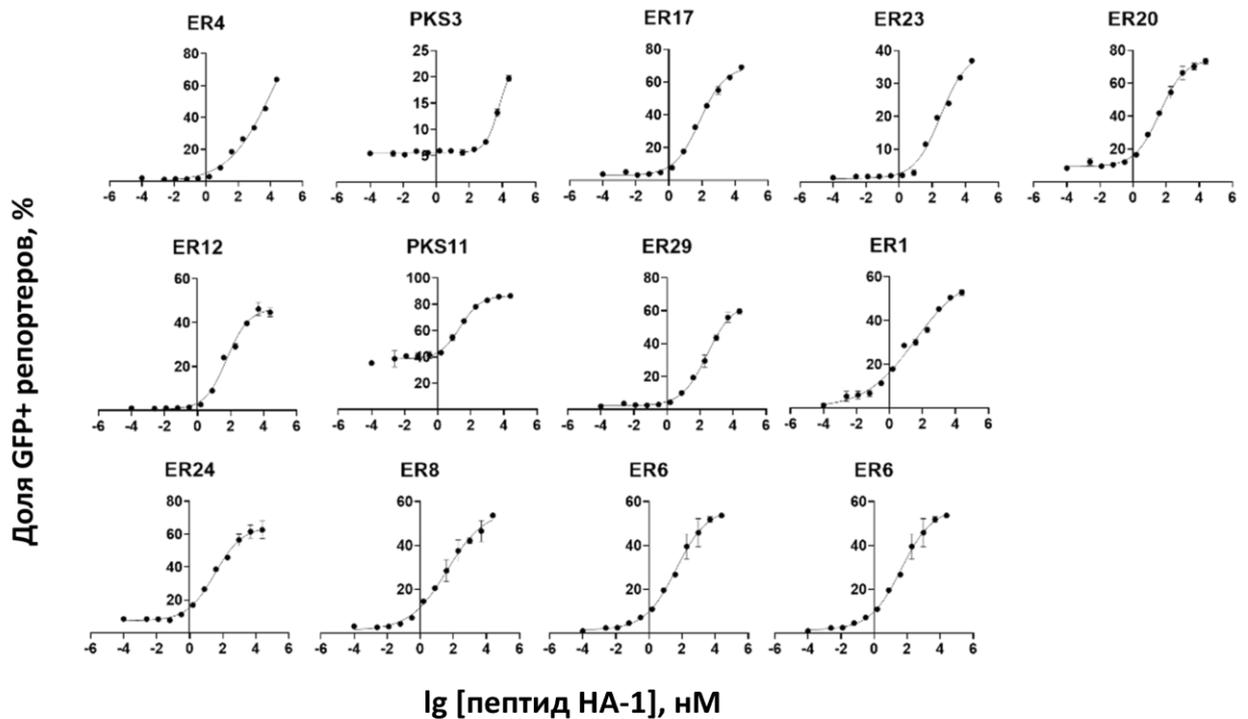
**Рисунок 3. График обогащения альфа и бета цепей ТКР в антиген-специфичной фракции Т-клеток.** (А) Репрезентативный график сравнения частоты субъединиц для донора р845. По осям отложена доля каждой уникальной субъединицы ТКР в общем количестве прочтений в антиген-специфичной фракции (ось абсцисс) и в неспецифичной фракции (ось ординат). Последовательности субъединиц, которые достоверно чаще встречались в CD137+ фракции (точный тест Фишера,  $p=0,05$ ), считались специфичными к НА-1 (отмечены цветом). Указана относительная частота каждой обогащенной субъединицы в соответствующей ячейке. Приведены графики для донора р845 (Б) Порядковый номер по частоте встречаемости субъединиц в каждой культуре, цветом отмечены субъединицы, обогащенные в антиген-специфической фракции.

Нами были определены последовательности 50  $\alpha$ -субъединиц и 68  $\beta$ -субъединиц как потенциально принадлежащие НА-1-специфичным ТКР.

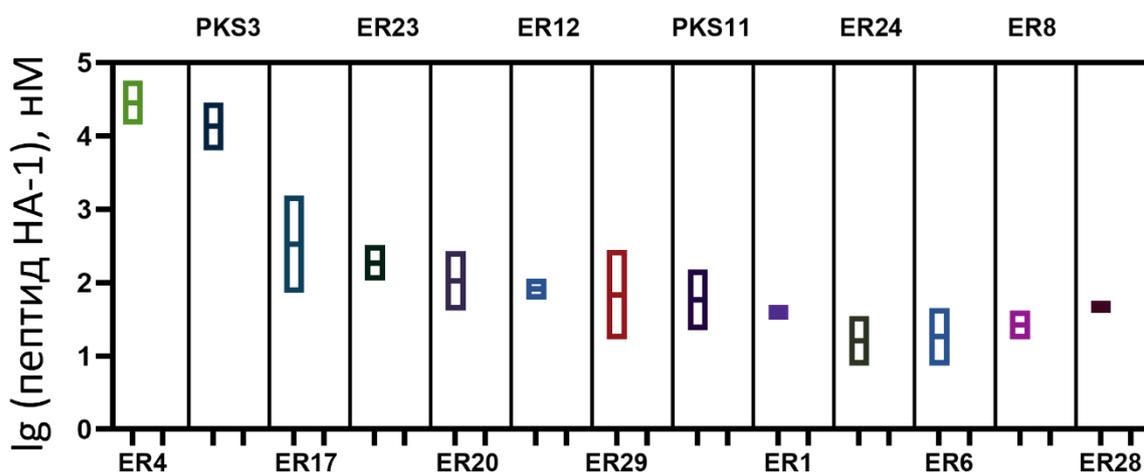
## **Выявление наиболее аффинного и не кросскреактивного ТКР с помощью модели репортерных лимфоцитов J76**

Были собраны 48 лентивирусных конструкторов, несущих трансгенные ТКР. Для сборки ТКР использовали только пары субъединиц, происходящие из одной культуры. Поскольку в некоторых культурах несколько  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц были определены как достоверно чаще встречающиеся в антиген-специфичной фракции, были собраны ТКР со всеми возможными комбинациями субъединиц, происходящих из этой культуры. С помощью лентивирусной трансдукции были получены 48 культур клеток репортерных Т-лимфоцитов J76, экспрессирующих трансгенные ТКР. Клетки J76 не имеют собственного ТКР, и экспрессируют флуоресцентные белки при активации сигнальных путей NF- $\kappa$ B, AP-1 и NFAT через трансгенный ТКР. Культуры репортерных лимфоцитов стимулировали клетками K562, презентующими экзогенный пептид HA-1 в контексте молекул HLA-A\*02. Культуры, в которых наблюдали экспрессию зеленого флуоресцентного белка после стимуляции, считали несущими функциональный HA-1-специфичный ТКР. Были найдены 13 таких культур, затем экспрессирующие трансген клетки из этих культур сортировали. Таким образом были получены культуры репортерных лимфоцитов, в которых более 99% клеток содержали трансген.

Для оценки функциональной аффинности HA-1-специфичных ТКР, специфичных к HA-1, репортерные клетки J76 стимулировали клетками K562, презентующими различные количества экзогенного пептида HA-1 в контексте молекул HLA-A\*02. Стимуляцию проводили одиннадцатью последовательными разведениями пептида HA-1, начиная с концентрации 4,88 нмоль/мл. Измеряли процент ответивших позитивных по экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) клеток для каждой экспериментальной точки и строили кривые титрования. Было проведено два независимых эксперимента, репрезентативные кривые приведены на рисунке 4. Измеренный по двум независимым экспериментам диапазон аффинности для HA-1-специфичных ТКР представлен на рисунке 5.



**Рисунок 4. Репрезентативные кривые титрования измерения аффинности трансгенных HA-1-специфичных ТКР.** На оси ординат отложен процент GFP+ клеток J76 по данным проточной цитофлуориметрии. Трансгенные клетки J76, экспрессирующие трансгенные HA-1-специфичные ТКР, стимулировали клетками линии K562, презентирующими пептид HA-1 в контексте молекул HLA-A\*02. Концентрация экзогенного пептида HA-1 в среде указана на оси абсцисс. Для каждого анализируемого ТКР каждая экспериментальная точка имеет две технических повторности, на рисунке приведены репрезентативные кривые титрования для одного эксперимента. Планки погрешностей означают абсолютную ошибку среднего.



**Рисунок 5. Оценка аффинности НА-1-специфичных ТКР.** Клетки линии J76 с функциональными ТКР, специфичными к НА-1, стимулировали клетками K562 с аллелем HLA-A\*02:01, нагруженными различными концентрациями пептида НА-1. Средние значения Ig полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) для каждого ТКР были получены из двух независимых титрований пептида.

Измерение функциональной аффинности ТКР позволяет очень приблизительно сравнить между собой аффинность разных ТКР, однако в целом можно сделать вывод, что в репертуаре здоровых доноров присутствуют как высоко-, так и низкоаффинные ТКР, распознающие НА-1. У высокоаффинных ТКР, к которым можно причислить ER20, ER12, ER29, PKS11, ER1, ER24, ER6, ER8 и ER28, кривая титрования вышла на верхнее плато (рис.4) при концентрации пептида в 1-5 нмоль/мл. Кривая титрования низкоаффинных ТКР не выходила на верхнее плато в пределах исследованных концентраций пептида, поэтому оценка их функциональной аффинности ещё менее точна.

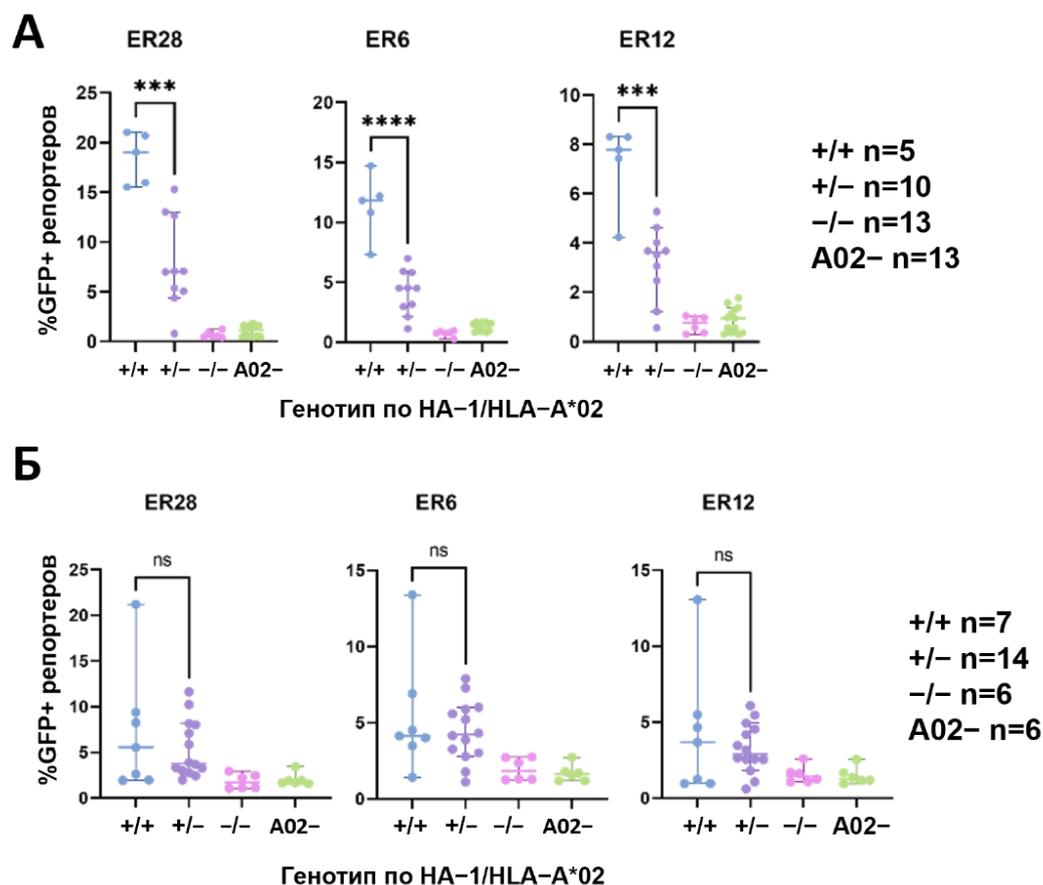
PKS11 показал высокий уровень функциональной аффинности. Однако, как видно из кривой титрования для PKS11 (рис.4), на нижнем плато кривой, где количество пептида было исчезающе мало, происходила активация репортеров на значительном уровне – около 40% клеток культуры репортеров.

Культура с PKS3 - другим ТКР, полученным из аллогенной экспансии – также демонстрировала уровень активации порядка 5% на нижнем плато кривой титрования. Это позволяет выдвинуть предположение, что ТКР PKS11 и PKS3 активируются не только пептидом HA-1, презентруемым в контексте молекул HLA-A\*02, но и самими молекулами HLA-A\*02, то есть ТКР PKS11 и PKS3 являются аллореактивными. Следовательно, хотя PKS3 обладает высокой аффинностью, он не подходит для Т-клеточной терапии. Для дальнейшего изучения нами были отобраны три высокоаффинных ТКР (ER6, ER12, ER28).

### **Репортерные лимфоциты с трансгенными ТКР распознают эндогенно процессируемый пептид HA-1**

Поиск ТКР из репертуара наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток сталкивается с определенными ограничениями. В частности, известно, что при аутологичных *in vitro* стимуляциях экзогенным пептидом значительная часть отобранных ТКР — низкоаффинные, поскольку при стимуляциях используются нефизиологично высокие концентрации антигена. В результате, отобранные ТКР часто неспособны распознавать антиген в физиологических условиях из-за низкой аффинности. Нами была исследована способность трансгенных ТКР распознавать эндогенно процессированный пептид HA-1 с использованием модели репортерных клеток J76. Линии J76, несущие трансгенные ТКР ER6, ER12 и ER28 стимулировали периферическими мононуклеарами здоровых доноров (рис. 6А), и пациентов со злокачественными новообразованиями крови (рис. 6Б). Образцы периферической крови пациентов отбирались при госпитализации и до назначения терапии, процент опухолевых клеток в образцах периферической крови варьировал от 0,5% до 95%. Здоровые доноры и пациенты имели четыре генотипа в зависимости от наличия аллеля HLA-A\*02 и гомо- или гетерозиготности аллельных вариантов HA-1: имеющие аллель HLA-A\*02 гомозиготы по иммуногенному аллелю HA-1 (HLA-A\*02<sup>+</sup> HA-1<sup>+/+</sup>), имеющие аллель HLA-A\*02 гетерозиготы по иммуногенному аллелю HA-1 (HLA-A\*02<sup>+</sup> HA-1<sup>+/-</sup>), имеющие аллель HLA-A\*02 гомозиготы по

неиммуногенному аллелю HA-1 (HLA-A\*02<sup>+</sup> HA-1<sup>-/-</sup>), и не имеющие HLA-A\*02. Для каждой стимуляции был также сделан позитивный контроль: в ячейку позитивного контроля дополнительно добавляли экзогенный пептид HA-1 до конечной концентрации 4,88 нмоль/мл.



**Рисунок 6. Репортерные клетки J76, экспрессирующие трансгенные ТКР ER28, ER6 ER12 демонстрируют ответ на HA-1-позитивные периферические мононуклеары здоровых доноров (А) и пациентов со злокачественными новообразованиями крови (Б). Каждая точка означает средний процент GFP<sup>+</sup> репортерных клеток между тремя техническими повторностями стимуляции клетками одного донора с указанным генотипом. Статистическая значимость: U-критерий Манна-Уитни \*\*\*\*p<0,0001, ns p > 0,05**

Ответ репортерных клеток был детектирован на клетки всех здоровых доноров, имеющих генотип HA-1<sup>+/+</sup> и 8 из 9 доноров, имеющих генотип HA-1<sup>+/-</sup>, тогда как при стимуляции клетками доноров с генотипами HA-1<sup>-/-</sup> или

HLA-A\*02<sup>-</sup> не наблюдалось активации. Стимуляция клетками здоровых доноров с генотипом HA-1<sup>+/+</sup> активировала больший процент репортерных Т-клеток по сравнению со стимуляцией клетками с генотипом HA-1<sup>+/-</sup>, что, вероятно, можно объяснить большим содержанием комплексов HA-1-HLA-A\*02 на поверхности клеток гомозигот. Тем не менее, такой разницы в активации репортерных лимфоцитов не наблюдали при стимуляции клетками пациентов со злокачественными новообразованиями крови (рис. 6Б).

Стимуляция клетками пациентов приводила в среднем к меньшему проценту активированных репортерных лимфоцитов. Клетки трёх пациентов с генотипом HA-1<sup>+/+</sup> и восьми с генотипом HA-1<sup>+/-</sup> вообще не были способны активировать репортерные лимфоциты до уровня, отличимого от стимуляции клетками с генотипами HA-1<sup>-/-</sup> или HLA-A\*02<sup>-</sup>. Этот эффект может объясняться экспрессией опухолевыми клетками ингибирующих иммунный ответ молекул, в частности PD-L1.

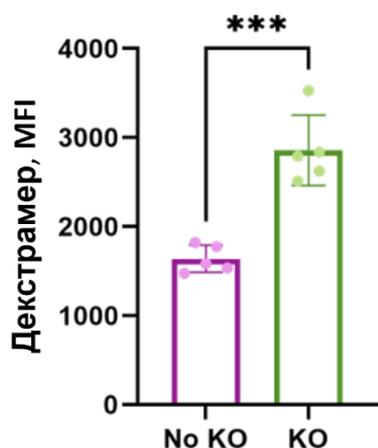
Ни одна из культур с ТКР ER28, ER12 или ER6 не демонстрировала активации при стимуляции клетками, не имеющими пептида HA-1 или молекул HLA-A\*02. Чтобы более достоверно подтвердить отсутствие кроссреактивности этих ТКР на другие аллели HLA, мы провели инкубацию репортерных клеток J76 с образцами периферических мононуклеаров от 21 здорового донора с наиболее частыми аллелями HLA, было протестировано 10 аллелей HLA-A, 12 аллелей HLA-B и 11 аллелей HLA-C. Таким образом мы показали, что ни один из отобранных нами ТКР не обладает кроссреактивностью к распространенным аллелям HLA, и следовательно эти ТКР могут быть безопасно применены в большинстве трансплантаций. В результате, по совокупности проведенных экспериментов, ER28 выглядит наиболее подходящим кандидатом для дальнейшего изучения.

### **Трансгенный HA-1-специфичный ТКР функционален в CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах**

Для наиболее эффективного применения трансгенных лимфоцитов необходимо обеспечить стабильную экспрессию трансгенного ТКР, а также

снизить конкуренцию за комплекс CD3 со стороны эндогенных субъединиц ТКР. Муринизация - использование мышинных аминокислотных последовательностей в константных регионах трансгенных ТКР - и внедрение дополнительной цистеиновой связи между белковыми субъединицами ТКР широко используются в разработке Т-клеточной терапии. Мышиные TRAC и TRBC, по-видимому, имеют более стабильную белковую конформацию, а дополнительная цистеиновая связь обеспечивает большую стабильность связывания субъединиц трансгенного ТКР. В результате, за счет большей стабильности, трансгенные ТКР имеют преимущество в связывании CD3 и тем самым обеспечивают большее присутствие на поверхности клетки. Кроме того, использование муринизированных TRAC и TRBC позволяет непосредственно оценивать эффективность трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

Второй способ увеличить присутствие трансгенных ТКР на поверхности клетки – нокаут эндогенного ТКР. Мы показали увеличение количества трансгенного ТКР на поверхности лимфоцитов после CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР с помощью окраски декстрамером. CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты пяти HLA-A\*02:01-отрицательных доноров были модифицированы трансгенным муринизированным ТКР ER28 лентивирусной трансдукцией. Затем каждая из пяти культур была разделена на две субкультуры, одна из которых подвергалась нокауту  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц эндогенного ТКР электропорацией рибонуклеопротеиновыми (RNP) комплексами, а контрольная культура подвергалась электропорации без RNP комплексов. Через 96 ч после электропорации производили окраску культур HA-1-HLA-A\*02:01 декстрамером (рис. 7).



**Рисунок 7. Нокаут эндогенного ТКР увеличивает присутствие трансгенного ТКР на поверхности клеток.** Представлены результаты окрашивания HA-1-HLA-A\*02:01 декстрамером CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов пяти доноров, трансдуцированных HA-1-специфичным ТКР ER28, с CRISPR/Cas9 нокаутом эндогенного ТКР (KO) и без (No KO). Высота столбцов соответствует медианному значению, планки погрешностей представляют абсолютную ошибку среднего. Статистическая значимость: t-критерий Стьюдента,  $p < 0,001$

Нокаут эндогенного ТКР увеличивал интенсивность флуоресценции культур при окраске декстрамером на 60-70%, что свидетельствует об увеличении количества трансгенных ТКР на поверхности клеток. Таким образом, нокаут эндогенного ТКР способствует улучшению эффекторных качеств трансгенных лимфоцитов, поскольку количество трансгенных ТКР на поверхности напрямую влияет на чувствительность клетки к стимуляции антигеном.

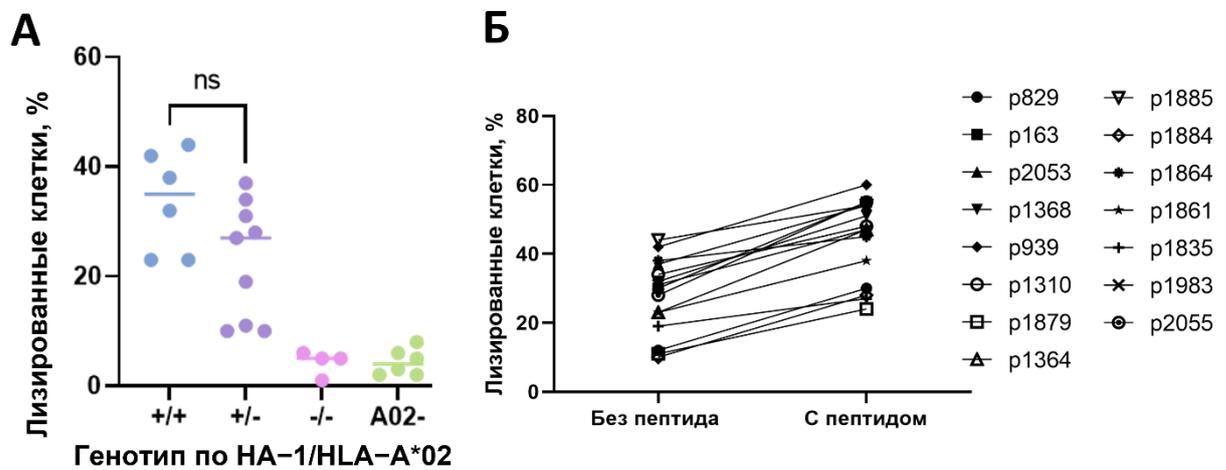
**CD8<sup>+</sup> Т-клетки с муринизированным трансгенным HA-1-специфичным ТКР и CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР обладают цитотоксической активностью по отношению к клеткам крови HA-1-положительных пациентов с различными гематологическими заболеваниями**

Последняя и наиболее важная из стоявших перед нами задач – показать *in vitro* цитотоксический эффект лимфоцитов с трансгенным HA-1-

специфичным ТКР. Мы продемонстрировали цитотоксический эффект CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с HA-1-специфичным трансгенным ТКР на периферических мононуклеарах пациентов со злокачественными новообразованиями крови. Культуры трансгенных лимфоцитов получали следующим образом: из двух HLA-A\*02:01-отрицательных доноров выделяли и активировали CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, проводили CRISPR/Cas нокаут эндогенных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц ТКР, и трансдуцировали лентивирусным вектором, несущим ТКР ER28. Далее трансгенные клетки сортировали за молекулы трансгенного ТКР. Клетки обогащенной культуры трансгенных Т-лимфоцитов культивировали с клетками периферической крови пациентов со злокачественными новообразованиями крови. Проводили два независимых эксперимента, эффекторами в которых выступали трансгенные лимфоциты от двух доноров. В каждом эксперименте, стимуляцию проводили в трех технических повторностях, также для каждого пациента делали позитивный контроль, в который добавляли экзогенный пептид HA-1 в количестве 4,88 нмоль/мл, и отрицательный контроль, в котором эффекторами выступали нетрансдуцированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты.

Оценка цитотоксичности трансгенных Т-лимфоцитов была произведена измерением процента клеток-мишеней в состоянии некроза или апоптоза методом проточной цитофлуориметрии. Клетки-эффекторы были помечены липофильным красителем DID и исключались из анализа. В анализе цитотоксичности были использованы клетки тех же пациентов, что и при стимуляции репортерных лимфоцитов J76. Среди имеющих аллель HLA-A\*02:01 пациентов, клетки шести пациентов имели генотип HA-1<sup>+/+</sup>, девяти пациентов имели генотип HA-1<sup>+/-</sup>, четырех – генотип HA-1<sup>-/-</sup>, также стимуляцию проводили клетками шести пациентов, не имеющих аллеля HLA-A\*02:01. Сравнение цитотоксичности трансгенных Т-лимфоцитов в отношении периферических мононуклеаров доноров с разным генотипом приведено на рис. 8. Каждая точка на графике представляет усредненное значение гибели клеток-мишеней между двумя независимыми

экспериментами, проведенными с использованием трансгенных эффекторов от двух доноров. Трансгенные лимфоциты демонстрируют выраженную цитотоксическую активность в отношении клеток всех пациентов с генотипом  $HA-1^{+/+}$  и шести из девяти пациентов с генотипом  $HA-1^{+/-}$ . Не было детектировано цитотоксичности в отношении клеток пациентов с генотипом  $HA-1^{-/-}$  или не имеющих аллеля  $HLA-A^*02:01$ . Это доказывает специфическую цитотоксичность лимфоцитов с трансгенным ТКР ER28 только в отношении клеток, презентующих пептид  $HA-1$  в контексте молекул  $HLA-A^*02:01$ .



**Рисунок 8. Трансгенные  $HA-1$ -специфичные  $CD8^+$  лимфоциты с нокаутом эндогенного ТКР специфически убивают клетки крови  $HA-1$ -положительных пациентов. (А).** Трансгенные  $CD8^+$  Т-клетки, модифицированные рецептором ER28, специфически уничтожают периферические мононуклеары  $HA-1$ -позитивных пациентов. Цитотоксичности по отношению к клеткам доноров, отрицательных по  $HA-1$  и  $HLA-A^*02$ , не наблюдалось. Каждая точка соответствует одному уникальному пациенту со злокачественными заболеваниями крови, отложенные значения для каждой точки являются арифметическим средним между результатами двух независимых экспериментов, эффекторами в которых выступали модифицированные  $CD8^+$  Т-лимфоциты двух здоровых доноров, каждый из двух независимых экспериментов выполнен в двух технических повторностях. Измерение проводили методом проточной

цитофлуориметрии. Статистическая значимость: U-критерий Манна-Уитни. ns:  $p > 0.05$ . Горизонтальная черта обозначает среднее значение в каждой группе. (Б) Трансгенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки демонстрируют большую цитотоксичность при добавлении экзогенного пептида HA-1 по сравнению с образцами, в которых присутствовал только эндогенно процессированный пептид. Статистическая значимость: дисперсионный анализ,  $p < 0,0001$ .

Добавление экзогенного пептида HA-1 увеличивало гибель клеток-мишеней при контакте с эффекторами (рис. 8Б), однако насыщающая концентрация антигена не приводила к полному лизису всех клеток-мишеней. Важно также отметить, что первичные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, по-видимому, обладают большей чувствительностью к антигену, чем репортерные клетки J76. При стимуляции клеток J76, экспрессирующих трансгенный ТКР ER28, клетками пациентов со злокачественными новообразованиями крови, для 3 из 7 пациентов с генотипом HA-1<sup>+/+</sup> и 8 из 14 пациентов с генотипом HA-1<sup>+/-</sup>, процент активированных репортерных лимфоцитов был неотличим от процента активации в негативных контролях. В то же время, при исследовании цитотоксического ответа трансгенных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенный ТКР ER28, не наблюдали значительной гибели только клеток трех HA-1-позитивных пациентов.

Большинство образцов крови принадлежало пациентам с ОМЛ, однако цитотоксический эффект наблюдали и в образцах от пациентов с другими диагнозами, в том числе Т- и В-клеточными ОЛЛ. Цитотоксический эффект, наблюдаемый на клетках пациентов с различными диагнозами, свидетельствует в пользу того, что HA-1 является универсальной иммуногенной мишенью в различных злокачественных гематологических новообразованиях.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Нами были получены трансгенные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, распознающие минорные антигены гистосовместимости АСС-1У и HA-1, подтверждена

функциональная активность трансгенных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичных к МАГ АСС-1У и НА-1.

По результатам работы можно сделать следующие **выводы**:

1. Стимуляция наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов здоровых доноров *in vitro* позволяет получить культуры Т-клеток, распознающих минорные антигены НА-1 и АСС-1У. Антиген-специфичные  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицы ТКР могут быть выявлены с помощью статистического анализа количества прочтений субъединиц при секвенировании репертуаров ТКР.
2. Модель репортерных Т-лимфоцитов J76 позволяет выявить функциональные комбинации субъединиц ТКР, оценить их аффинность и кроссреактивность.
3. CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты с нокаутом эндогенного ТКР методом CRISPR/Cas, несущие трансгенный НА-1-специфичный ТКР ER28, специфично уничтожают *in vitro* клетки периферической крови пациентов с минорным антигеном НА-1, не затрагивая клетки, не несущие этого антигена.

Использованный в работе метод изучения ТКР можно рекомендовать для поиска ТКР, специфичных к различным терапевтически перспективным Т-клеточным антигенам.

Дальнейшим направлением исследования является изучение цитотоксичности трансгенных НА-1-специфичных лимфоцитов *in vivo* на мышинной модели.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web  
of Science, Scopus и RSCI:**

- 1 **Pilunov A.**, Romaniuk D., Shmelev A., Sheetikov S., Gabashvili A., Khmelevskaya A., Dianov D., Zornikova K., Shakirova N., Vagida M.,

- Bogolyubova A., Efimov G. Transgenic HA-1-Specific CD8+ T-Lymphocytes Selectively Target Leukemic Cells // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15, № 5 P. 1592 Импакт-фактор WoS (JIF) 6.575; Объем: 2,19 печатных листа\*
- 2 Романюк Д. С., **Пилунов А.М.**, Ефимов Г.А., Боголюбова А.В., Паровичникова Е.Н. Минорные антигены гистосовместимости, представляемые в HLA-A\* 02: 01, и стратегии их поиска // *Онкогематология*. – 2023. – Т. 18. – №. 3 – С. 115-124. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 0.735; Объем: 1.15 печатных листов\*
- 3 **Пилунов А. М.**, Романюк Д.С., Ефимов Г.А., Савченко В.Г. Минорные антигены гистосовместимости как мишени Т-клеточной иммунотерапии // *Гематология и трансфузиология*. – 2021. – Т. 66. – №. 3 – С. 322-345., Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 0.898; Объем: 2,77 печатных листа\*
- 4 **Пилунов А. М.**, Кучмий А.А, Шитиков С.А., Филькин С.Ю., Романюк Д.С., Розов Ф.Н., Ефимов Г.А. Модификация цитотоксических лимфоцитов рецептором, специфичным к минорному антигену гистосовместимости АСС1-У // *Молекулярная биология*. – 2019. – Т. 53. – № 3. – С. 456-466. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 0,991; Объем: 1,04 печатных листа\*
- Pilunov A. M.**, Kuchmiy A.A., Sheetikov S.A., Filkin S.Y., Romaniuk D.S., Rozov F.N., Efimov G.A.. Modification of Cytotoxic Lymphocytes with T Cell Receptor Specific for Minor Histocompatibility Antigen ACC-1Y // *Molecular Biology*. – 2019. – Т. 53. – С. 402-410.
- \* - Вклад автора в публикации определен, см. раздел автореферата «Личный вклад автора».