

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

На правах рукописи

ПИЛУНОВ АРТЕМ МИХАЙЛОВИЧ

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

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Григорий Александрович Ефимов

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Связь иммунного ответа на МАГ и терапевтического успеха алло-ТГСК.....	13
1.2 История изучения минорных антигенов гистосовместимости.....	15
1.3 Механизм возникновения и иммуногенности МАГ	18
1.4 Преимущества и недостатки МАГ как мишеней для иммунотерапии	22
1.5 Клинически перспективные МАГ	24
1.5.1 НА-1	24
1.5.2 НА-2	26
1.5.3 АСС1/2	28
1.6 Клинические исследования МАГ-специфичной терапии	29
1.7 МАГ-специфичная терапия в контексте Т-клеточных терапий.....	35
1.8 Заключение	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1 Получение антиген-специфичных Т-клеточных экспансий	38
2.2 Получение лимфобластоидных клеточных линий в качестве антигенпрезентирующих клеток.	39
2.3 Окраска HLA-тетрамерами.....	40
2.4 Изучение эффекторных качеств CD8 ⁺ Т-клеточного клона, специфичного к АСС-1У, методами внутриклеточной окраски на IFN- γ и подсчета процента гибели клеток-мишеней.....	40
2.6 Внеклеточное окрашивание на γ -интерферон.....	41
2.7 Секвенирование генов α и β субъединиц Т-клеточного рецептора, специфичного к АСС-1У.....	42
2.8 Клонирование генов α и β субъединиц Т-клеточного рецептора, специфичного к АСС-1У в лентивирусный вектор.....	43
2.9 Поиск нуклеотидных последовательностей субъединиц ТКР, предположительно специфичных к НА-1.....	44
2.10 Клонирование генов субъединиц ТКР, потенциально специфичных к НА-1, в модульный лентивирусный конструктор	47
2.11 Клонирование нуклеотидных последовательностей TRAV и TRBV для поиска ТКР, специфичных к НА-1.....	49
2.12 Сборка вектора с трансгенным ТКР методом клонирования Golden Gate	49

2.13	Получение лентивирусного супернатанта.....	50
2.14	Оценка вирусного титра методом проточной цитофлуориметрии.....	51
2.15	Получение клеточной линии K562 с трансгенным HLA-A*02	52
2.16	Получение клеточной линии с J76 трансгенным CD2/28 и CD8.....	53
2.17	Получение gRNA	54
2.18	Сборка рибонуклеопротеиновых комплексов Cas9/gRNA.....	55
2.19	CRISPR/Cas9 нокаут ТКР в клетках линии Jurkat E6-1	56
2.20	Подготовка планшетов, покрытых ретронектином	56
2.21	CRISPR/Cas9 нокаут ТКР в первичной культуре Т-лимфоцитов, совмещенный с лентивирусной трансдукцией	57
2.22	Обогащение и культивация трансгенных Т-лимфоцитов	58
2.23	Изучение функциональной активности трансгенных ТКР	58
2.24	Изучение аффинности ТКР	60
2.25	Стимуляция репортерных линий J76 периферическими мононуклеарами, презентующими эндогенный пептид HA-1	62
2.26	Изучение функциональной активности трансгенных CD8 ⁺ Т-клеток методом ИФА	63
2.27	Изучение цитотоксичности CD8 ⁺ Т-клеток, модифицированных трансгенным ТКР	63
2.28	Фрагментный анализ ДНК клеток после редактирования CRISPR/Cas.....	64
2.29	Оценка количества вирусных интеграций на геном методом ПЦР в реальном времени.....	65
2.30	Лентивирусная трансдукция CD8 ⁺ Т-лимфоцитов с использованием полибрена ...	65
2.31	Статистическая обработка результатов.....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ		69
3.1	Получение культур CD8 ⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к ACC-1Y	69
3.2	CD8 ⁺ Т-клетки, модифицированные специфичным к ACC-1Y трансгенным ТКР, секретируют IFN-γ при антигенной стимуляции.....	72
3.3	Биоинформатический анализ репертуара ТКР, специфичных к минорному антигену HA-1, показывает высокую степень уникальности последовательностей CDR3 и большую представленность гена <i>TRBV7-9</i>	75
3.4	Исследование на модели репортерных клеток J76 выявило 13 функциональных HA-1-специфичных ТКР	85
3.5	Изучение свойств ТКР, специфичных к HA-1, на модели репортерных лимфоцитов, выявило наиболее аффинные ТКР, не обладающие аллореактивностью HLA-A*02	86
3.6	Репортерные лимфоциты с трансгенными ТКР распознают эндогенно процессируемый пептид HA-1	92
3.7	Изучение эффективности CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР на клетках Jurkat E6-1	97
3.8	Трансгенный HA-1-специфичный ТКР функционален в CD8 ⁺ Т-лимфоцитах.....	100
3.9	CD8 ⁺ Т-клетки с мураинизированным трансгенным HA-1-специфичным ТКР и CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР обладают цитотоксичностью в отношении	

клеток крови НА-1-положительных пациентов с различными онкогематологическими заболеваниями	103
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	110
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
БЛАГОДАРНОСТИ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	134

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр
ДК - дендритные клетки
МАГ – минорные антигены гистосовместимости
ММ – множественная миелома
нсОНП – несинонимичный однонуклеотидный полиморфизм
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелобластный лейкоз
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РТПЛ – реакция трансплантат против лейкоза
РТПХ – реакция трансплантат против хозяина
ТКР – Т-клеточный рецептор
ФБС – фетальная бычья сыворотка
ЦМВ – цитомегаловирус
В-ЛКЛ – В-клеточная лимфобластоидная линия
CAR-T – chimeric antigen receptor T-cells, Т-клетки с химерным антигенным рецептором
GM-CSF – granulocyte macrophage colony stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
gRNA – guide RNA, гайд-РНК
HLA – human leukocyte antigen, человеческий лейкоцитарный антиген

IL – интерлейкин

IFN- γ – интерферон-гамма

LTR – long terminal repeats, длинные концевые повторы

MFI – mean fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции

NGS – next generation sequencing, высокопроизводительное секвенирование нового поколения

RNP – ribonucleoprotein, рибонуклеопротеин

TRAC – T-receptor alpha constant, константная часть α -субъединицы T-рецептора

TRAV – T-receptor alpha variable, переменная часть α -субъединицы T-рецептора

TRBC – T-receptor beta constant, константная часть β -субъединицы T-рецептора

TRBV – T-receptor beta variable, переменная часть β -субъединицы T-рецептора

UTR – untranslated region, нетранслируемая область

WPRE – woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита

ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является золотым стандартом терапии острых миелоидных (ОМЛ) и лимфобластных (ОЛЛ) лейкозов [1]. Тем не менее, рецидив злокачественного заболевания после алло-ТГСК развивается приблизительно у половины пациентов [2–6], что делает крайне актуальной разработку методов терапии рецидивов [7–9]. Терапия методом адоптивного переноса Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) показала высокую эффективность при лечении В-клеточных лейкозов [10], 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 [11]. В таком случае необходим более избирательный подход к поиску мишеней иммунотерапии. Перспективной мишенью для терапии лейкозов являются минорные антигены гистосовместимости (МАГ) [12–14] – 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 адоптивном переносе донорских CD8⁺ 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 AСС-1Y 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.

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⁺ Т-лимфоцитах.
2. Провести анализ репертуара ТКР в культурах Т-клеток, полученных стимуляцией наивных CD8⁺ 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⁺ 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

Впервые для детекции субъединиц ТКР, специфичных к минорному антигену HA-1, был применен метод, основанный на *in vitro* стимуляции наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов дендритными клетками, нагруженными пептидом интереса, сепарации антиген-специфичных лимфоцитов за счет экспрессии ими молекул активации лимфоцитов и сравнении репертуара субъединиц ТКР в антиген-специфичной и антиген-неспецифической фракциях лимфоцитов. Впервые был применен подход выявления потенциальных пар альфа и бета субъединиц ТКР за счет анализа их обогащения в отдельных культурах CD8⁺ Т-лимфоцитов, и последующей их сборки в лентивирусные конструкции.

Описаны тринадцать новых HA-1-специфичных ТКР и один АСС-1У-специфичный ТКР. На основе оценки аффинности и аллореактивности был

отобран ТКР ER28, как обладающий наибольшей аффинностью к пептиду HA-1 и не показавший аллореактивности в функциональных тестах. Показано, что CD8⁺ Т-лимфоциты с CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР и модифицированные трансгенным ТКР ER28 обладают цитотоксичностью только в отношении клеток, презентующих эндогенный или экзогенный пептид 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 с лейкозами, а также человеческие клеточные линии. Все доноры и пациенты дали информированное согласие на проведение исследований. Эксперименты были одобрены 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⁺ лимфоцитов МАГ-отрицательных

здоровых доноров. Высокопроизводительное секвенирование репертуаров ТКР и их биформатический анализ были выполнены в соответствии с ранее опубликованными протоколами и с помощью программ анализа, находящихся в открытом доступе. Для исследования репертуара HA-1-специфичных ТКР был разработан лентивирусный вектор на основе системы быстрого клонирования Golden Gate. Исследование функциональной активности HA-1-специфичных ТКР проводили на репортерных лимфоцитах J76. В качестве клеток-стимуляторов для экспериментов по исследованию трансгенных HA-1-специфичных ТКР выступали полученные нами клетки линии K562, экспрессирующие трансгенные молекулы HLA-A*02, а также криоконсервированные образцы периферической крови здоровых доноров и пациентов с различными типами злокачественных новообразований крови. Цитотоксичность трансгенных CD8⁺ Т-клеток оценивали на замороженных образцах периферической крови пациентов со злокачественными новообразованиями крови с помощью измерения методом проточной цитофлуориметрии доли клеток-мишеней, находящихся в состоянии апоптоза или некроза. Данные глубокого HLA типирования пациентов и доноров предоставлены ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

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 воспроизводили дважды, в качестве эффекторов выступали лимфоциты от двух разных здоровых доноров. Каждая экспериментальная точка была выполнена в двух технических повторностях, и таким образом был изучен цитотоксический ответ на клетки крови 25 пациентов со злокачественными новообразованиями крови. Каждой экспериментальной точке соответствовало два негативных контроля: мишени без добавления эффекторов, мишени с добавлением нетрансдуцированных лимфоцитов, и один позитивный контроль: мишени с добавлением

трансгенных HA-1-специфичных Т-лимфоцитов и синтетического пептида HA-1. Также для демонстрации функциональности трансгенных HA-1-специфичных лимфоцитов были использованы ортогональные методы: окраска HLA-декстрамером и измерение секреции IFN- γ . Методы исследования функциональной активности ТКР, а также методы биоинформатического анализа репертуаров ТКР соответствуют международным стандартам. Для поиска HA-1-специфичных ТКР, были проанализированы репертуары 46 первичных HA-1-специфичных первичных Т-клеточных культур из восьми здоровых доноров.

Отсутствие аллореактивности трех HA-1-специфичных ТКР было показано на образцах клеток от 21 здорового донора, несущих 10 аллелей HLA-A, 16 аллелей HLA-B и 11 аллелей HLA-C.

Достоверность эффективности CRISPR/Cas нокаута оценивали с помощью трех независимых экспериментов на клеточной линии Jurkat E6-1 и затем на клетках пяти здоровых доноров, эффект увеличения интенсивности окраски декстрамером CD8⁺ Т-лимфоцитов после нокаута имел статистическую значимость.

Эффект более низкой поверхностной экспрессии HLA-A*02 на клетках крови пациентов с гематологическими заболеваниями наблюдали на выборке из 24 пациентов и 28 здоровых доноров.

Достоверность полученных результатов оценивали с использованием t-критерия Стьюдента в случае нормального распределения. Для анализа непараметрических данных (уровня поверхностной экспрессии HLA на клетках крови здоровых доноров и пациентов, измерение цитотоксичности трансгенных лимфоцитов в отношении опухолевых клеток) использовали критерий Манна-Уитни. Анализ статистических данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Метод *in vitro* стимуляции наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов дендритными клетками, презентующими 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⁺ 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 конструкт, кодирующий АСС-1У-специфичный ТКР, была проведена работа по оптимизации протокола получения лентивирусных частиц в линии НЕК293Т. Автором были получены трансгенные CD8⁺ Т-лимфоциты, специфичные к МАГ АСС-1У, и исследована их функциональная активность. Первичная культура CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к АСС-1У, была получена Анной Кучмий и Савелием Шитиковым.

В исследовании ТКР, специфичных к HA-1, автором была создана панель лентивирусных конструктов, кодирующих трансгенные ТКР, получена панель трансгенных репортерных клеточных линий, несущих эти ТКР. Автором был адаптирован протокол CRISPR/Cas модификации CD8⁺ Т-лимфоцитов, совмещенной с лентивирусной трансдукцией. Автором были разработаны и проведены эксперименты по изучению функциональной активности и цитотоксичности HA-1-специфичных ТКР, проведен

статистический анализ и визуализация данных. Биоинформатический анализ выполнен совместно с Александрой Хмелевской. 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 HA-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 ACC-1Y

Результаты, представленные в диссертации, опубликованы в рецензируемых научных журналах, индексируемых в системе Scopus:

- 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
- 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.

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.

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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Связь иммунного ответа на МАГ и терапевтического успеха алло-ТГСК

Алло-ТГСК широко используется в лечении гематологических заболеваний, в частности острого миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза. Считается, что терапевтический эффект трансплантации, помимо замещения кроветворения на донорское, обеспечивается также реакцией “трансплантат против лейкоза” (РТПЛ), при которой злокачественные клетки крови реципиента, оставшиеся после кондиционирования, уничтожаются донорскими Т- и НК-клетками [15–17]. Однако иммунный ответ может быть направлен и на здоровые ткани реципиента, приводя к реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) [18–20]. Ранее полагалось, что основной целью РТПХ являются молекулы HLA,

аллели которых различаются у донора и реципиента, [21] и реакция в основном обеспечивается - кросс-реактивными Т-клетки памяти донора [22]. В дальнейшем появились противоречащие этой гипотезе свидетельства - РТПХ наблюдали и при полностью HLA-совместимой трансплантации. В этом случае иммунный ответ направлен на минорные антигены гистосовместимости [12–14] - полиморфные пептиды, презентруемые в молекулах HLA, и происходящие из белковых продуктов генов с несинонимичными однонуклеотидными полиморфизмами (нсОНП). При этом в отличие от кроссреактивных Т-клеток, специфичные к МАГ наиболее часто относятся к наивным клеткам [23]. Подробно причины иммуногенности МАГ рассмотрены в главе 1.3.

Далее мы рассмотрим принципиальный вопрос о взаимосвязи РТПЛ и РТПХ, и роли МАГ в этих процессах. Анализ литературных данных показывает, что для некоторых тканеспецифичных МАГ возможна РТПЛ без РТПХ, и именно эти МАГ будут наиболее приоритетны для терапии.

Данные о связи РТПХ и РТПЛ противоречивы. Ряд исследований говорят о снижении риска рецидива ОМЛ и ОЛЛ при развитии РТПХ [24–26]. Другие работы показывают, что при полностью совместимой по генам HLA трансплантации (аутологичной или сингенной) риск рецидива заболевания значительно выше, чем при алло-ТГСК, что может объясняться отсутствием иммунного ответа на идентичные по антигенам злокачественные клетки реципиента [25,27]. Однако более масштабное исследование показывает, что степень генетических различий между донором и реципиентом, напротив, снижает выживаемость [28]. В крупном ретроспективном исследовании был проанализирован исход 32828 алло-ТГСК и 59692 аутологичных трансплантаций. Алло-ТГСК были ранжированы на 9 групп в зависимости от родства донора и реципиента, совместимости по генам HLA и совместимости по Y-хромосомному МАГ H-Y. Было установлено, что большая степень различий донора и реципиента приводит к большей смертности. Эффект наблюдали при подсчете как несвязанных с рецидивом заболевания смертей,

так и общей выживаемости. Из этого исследования можно сделать вывод, что возникновение РТПХ не означает ответ на клетки опухоли. Наиболее вероятно, РТПЛ, то есть основной терапевтический механизм трансплантации, вызывается не молекулами HLA, а другими антигенами, а именно небольшим количеством МАГ, специфичных для клеток крови [29]. Минорные антигены гистосовместимости HA-1 и ACC-1Y происходят из генов *ARHGAP45* и *BCL2A1*, экспрессирующихся исключительно в лимфоидной ткани, эти гены экспрессируются также в клетках рака [30,31], потому МАГ HA-1 и ACC-1Y перспективны для разработки терапии.

1.2 История изучения минорных антигенов гистосовместимости

Первые упоминания о МАГ появляются 1975 году [32]. Подозрения о существовании новых иммунологических антигенов, не связанных с молекулами МНС возникли, когда в экспериментах по трансфузии крови между мышами из линий с одинаковыми генами МНС наблюдали возникновение РТПХ. Было установлено, что риск РТПХ можно минимизировать, если удалить лимфоциты перед переливанием [33,34]. После установления пептидной природы Т-клеточных антигенов, презентированных в молекулах МНС [35], исследователи рассматривали именно пептидную сущность МАГ как наиболее вероятную, что и было доказано, а иммуногенность МАГ объяснялась аллельными различиями в пептиде между субъектами трансфузии [36].

Позже МАГ были обнаружены у людей [37,38]. Различиями в МАГ было объяснено возникновение РТПХ в полностью HLA-совместимых алло-ТГСК [39]. Различия между донором и реципиентом даже в одной полиморфной аминокислоте пептида МАГ достаточно для возникновения иммунного ответа [40]. Объясняется это тем, что Т-клетки МАГ-отрицательного донора не встречали МАГ в процессе отрицательного отбора в тимусе [41] и не были элиминированы [42].

В результате подробного изучения РТПХ при родственной HLA-идентичной трансплантации был описан первый соматический МАГ человека, названный HA [43]. Изучение цитотоксического МАГ-специфичного Т-клеточного клона позволило выяснить, что этот антиген презентруется в белке HLA аллельного варианта A*02 и обладает высокой популяционной частотой.

Той же группой исследователей были открыты антигены HA1, HA2, HA3, HA4 и HA5. Была оценена популяционная частота этих антигенов: HA2 и HA3 встречались почти у всех людей, HA1 был не таким частым (около 70% доноров), а HA4 и HA5 были довольно редки [44]. При этом специфичные к HA-1 Т-клеточные клоны были обнаружены практически во всех несовместимых по этому антигену трансплантациях, чего не наблюдалось для других антигенов; более того, при несовпадении по нескольким МАГ, HA-1-специфичные клоны всегда выходили на первое место по встречаемости у каждого реципиента с РТПХ [45]. Поэтому была выдвинута гипотеза об иммунодоминантности HA-1, то есть предполагалось, что иммунный ответ на HA-1 ингибирует ответ на другие антигены.

Была описана иерархичность иммунодоминантности антигенов в следующем порядке по убыванию: HLA, HA-1, Y-хромосомные антигены; менее доминантные антигены всегда распознаются меньшим количеством Т-клеточных клонов [46]. На мышах было показано, что ответ на иммунодоминантные МАГ способен элиминировать злокачественные клетки крови, а ответ на другие МАГ был для этого недостаточен [47], [48]. Следовательно, только иммунодоминантные МАГ могут представлять интерес как мишени иммунотерапии.

Однако количество иммунодоминантных антигенов невелико. Лишь менее половины процента всех презентруемых в HLA пептидов (с константой диссоциации пептид-HLA менее 500 нМ), обладают настолько низкой константой диссоциации (менее 50 нМ), чтобы стать иммунодоминантными антигенами. В реальности их процент оценивается ещё меньше (меньше 0,2%

от презентруемых пептидов) из-за особенностей механизма доставки пептидов в молекулы HLA и отсутствия ТКР, способных распознать эти антигены [49].

В основном иммунодоминантность возникает из-за конкуренции пептидов за связывание с молекулами HLA [50]. Наиболее аффинный пептид вытесняет пептиды с меньшей аффинностью связывания из молекул HLA [51,52]. Существует и другой механизм – для одних антигенов, распознающие их ТКР встречаются значительно чаще, чем для других антигенов. Например, иммунодоминантный мышинный МАГ B6dom1 связывается с молекулами MHC с такой же аффинностью, что и антигены H3 и H13 [53]. Однако исследование наивных Т-клеточных репертуаров отрицательных по этим МАГ мышей установило, что практически во всех мышцах B6dom1-специфичные ТКР изначально более частые, по-видимому, из-за особенностей VDJ-рекомбинации.

Степень различия по МАГ влияет на клинический исход [54]. В 327 HLA-совместимых трансплантациях донор и реципиент были генотипированы по 17 МАГ, представляемых в молекулах HLA 6 разных аллелей. Было показано, что несовпадение по соматическим МАГ приводит к меньшему проценту рецидивов. При этом только несоответствие по Y-хромосомным МАГ увеличивало риск РТПХ, а аутомные МАГ риск РТПХ не повышали. Детектируемые у 10-33% реципиентов донорские МАГ-специфичные клетки служили маркером лучшей выживаемости и меньшего риска рецидива, что указывает на важную роль МАГ-специфичных клонов в РТПЛ. В данной работе также наблюдался феномен иммунодоминантности, выраженный в разной иммуногенности антигенов. Так, CD8⁺ Т-клетки, специфичные к HA1, HA2, PANE1, LRH1, ACC1, и к Y-хромосомным МАГ HУ.A2 и HУ.B7 были обнаружены у 25%-60% реципиентов с несовместимостью по МАГ. HA8, SP110, и ZAPHIR вызывали иммунный ответ у 10%-20% реципиентов. В то же время, Т-клеточный ответ на МАГ ADIR, HwA11, ECGF, HEATR, и HУ.B8 не был обнаружен, несмотря на иммуногенные несовпадения по этим МАГ.

Таким образом, при трансплантациях типирование на МАГ стоит ограничить иммунодоминантными антигенами [55].

1.3 Механизм возникновения и иммуногенности МАГ

Y-хромосомные МАГ возникают при трансплантации от донора женского пола к реципиенту мужского пола, поскольку в женском организме нет происходящих из Y-хромосомы пептидных антигенов и как следствие, центральной толерантности к ним [56]. Однако большинство МАГ имеет аутомное происхождение. Выделяют доминантно-рецессивный и кодоминантный механизм МАГ. Вариант возникновения минорных антигенов по доминантно-рецессивному принципу, то есть, когда иммуногенный только один аллельный вариант, проиллюстрирован на рисунке 1. В результате трансляции производится некоторое количество дефектных рибосомальных продуктов [57] по нескольким механизмам: трансляция пре-сплайсированной мРНК [58], трансляция мРНК, подвергающейся деградации при регуляторной РНК-интерференции [59] или трансляция некодирующих участков генома [60]. Дефектные рибосомальные продукты, а также белки с неправильной конформацией или истекшим жизненным сроком убиквитинилируются [61], а затем подвергаются расщеплению протеасомой на пептиды длиной 4-20 аминокислот [62,63]. Полученные пептиды транспортируются белком-транспортером (Transporter associated with antigen processing - ТАР) в эндоплазматический ретикулум [64], где они могут связываться с одним из белков HLA, а затем выйти на поверхность клетки в комплексе с белками HLA [65].

Итак, если в презентруемом пептиде есть переменная аминокислота, возможно возникновение МАГ двух типов:

1. Кодоминантные МАГ, когда в HLA презентруются два аллельных варианта пептида. Оба аллеля могут быть иммуногенными.
2. Доминантно-рецессивные МАГ, когда одна из аллельных форм пептида не презентруется в HLA и соответственно, иммуногенен только второй аллель.

Доминантно-рецессивный путь наиболее распространен, составляя 97% всех МАГ [66]. Полиморфизм в аминокислотной последовательности способен изменить исход любого шага процессинга антигена. Для доминантно-рецессивных МАГ возможны следующие механизмы: неиммуногенный вариант МАГ HA-3 расщепляется протеасомой на слишком мелкие для презентации фрагменты [67], альтернативный пептид антигена HA-8 не связывается с ТАР-транспортером [68], а альтернативный пептид HA-1 слабее связывается с молекулами HLA [69].

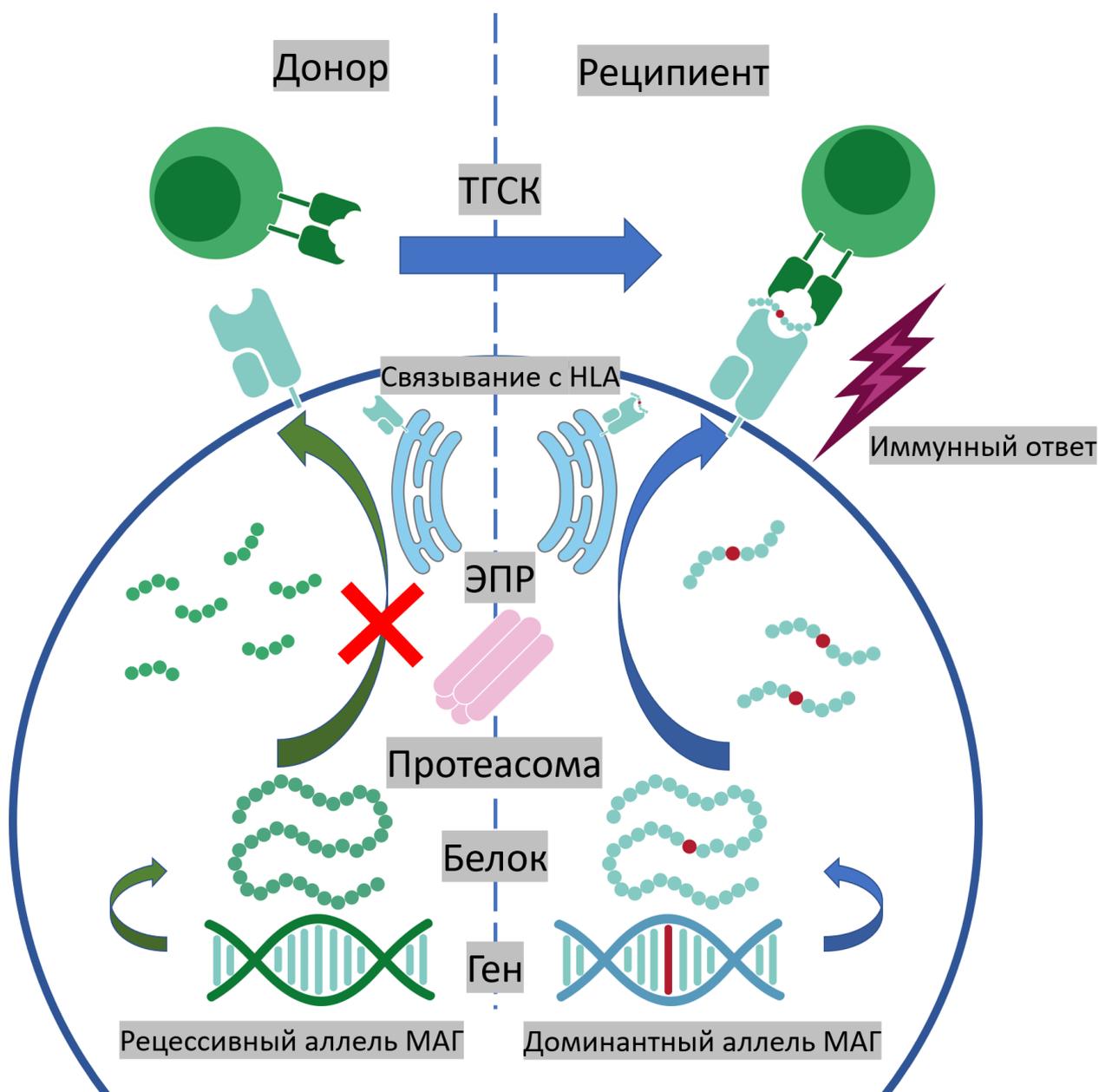


Рисунок 1. Образование МАГ по доминантно-рецессивному механизму. Белок, содержащий полиморфизм (отмечен красным), расщепляется протеасомой на пептиды, которые транспортируются в ЭПР, где они связываются с HLA, а затем выходят на

поверхность клетки. Нарушения в какой-либо из этих стадий приводят к отсутствию пептида из гена рецессивного аллеля МАГ на поверхности клетки. Лимфоциты донора, не имеющего МАГ, способны распознать клетки реципиента, имеющего МАГ. Опубликовано в работе [70]

Более чем в 90% случаев, приводящий к возникновению МАГ полиморфизм не влияет на функциональность белка [66]. Однако альтернативный аллель МАГ может происходить и из аллеля, связанного с утратой функции белка. В частности, МАГ LRH-1 возникает из-за сдвига рамки считывания в альтернативном аллеле [71], к возникновению МАГ PANE1 приводит стоп-кодон, [72]; транслируемый интрон служит причиной возникновения ZAPHIR [73], в аллельном варианте МАГ ACC-6 отсутствует экзон [74], а в некоторых случаях МАГ возникает из-за удаления гена целиком (UGT2B17/A2) [75]. Скорее всего, открыты ещё не все пути образования МАГ [76]. МАГ может возникать и в результате посттрансляционной модификации, примером такого МАГ служит цистеинилированный пептид Y-хромосомного белка SMCY [77].

Эксперименты на клеточных линиях из проекта «1000 геномов» [78] показывают, что в иммунопептидоме, то есть фракции пептидов, связанных с HLA, представлена лишь половина процента от всех генетических полиморфизмов, при этом реально иммуногенны из них лишь 0.22%, и это полностью соответствует оценке иммунодоминантности антигенов из более ранних исследований [49].

Доминантно-рецессивные МАГ не всегда возникают из-за отсутствия презентации одного из аллельных вариантов пептида в молекулах HLA. В частности, оба аллельных варианта пептидов, соответствующих минорным антигенам LB-CLYBL-1Y, LB-NISCH-1A и LB-SSR1-1S [79] одинаково представлены в HLA, что было выяснено методом масс-спектрометрии на модели клеток T2, не имеющих собственных пептидов в молекулах HLA. Однако исследователям не удалось получить T-клеточные клоны, которые бы распознавали альтернативные варианты этих пептидов, и наиболее вероятно

отсутствие иммуногенности этих вариантов можно объяснить тем, что способные распознавать эти пептиды Т-клетки не проходят отбор в тимусе.

Почти все известные МАГ представлены в HLA I класса, но описаны и МАГ связанные с HLA II класса, возникающие при презентации пептидов, полученных от других клеток эндцитозом. Известны случаи развития РТПЛ на МАГ из HLA II класса [80]. Однако возможность терапевтического использования этих антигенов остается под вопросом. Привлекательна для терапии преимущественная экспрессия HLA II класса в антиген-презентирующих клетках, благодаря чему иммунный ответ может быть ограничен лимфоидной тканью. Но сильным недостатком МАГ HLA II класса как терапевтической мишени является то, что клетки опухоли легко могут утратить экспрессию генов HLA II класса [81,82], ведь в отличие от молекул HLA-I класса, белки HLA II класса не защищают от цитотоксического воздействия натуральных киллеров [83]. Следовательно, именно МАГ, представленные в молекулах HLA I класса, наиболее перспективные мишени для разработки иммунотерапии.

С помощью биоинформатического анализа было открыто большое количество потенциально иммуногенных полиморфизмов [60,66]. Тем не менее, число известных на настоящий момент МАГ невелико. На 2016 год было описано 48 МАГ, презентруемых в молекулах HLA I класса и 8 МАГ, презентруемых в молекулах HLA II класса [76]. Исследование 2020 года, проведенное на материалах проекта “1000 геномов”, расширило спектр известных МАГ в HLA I класса до 63 [84].

Иммунодоминантность существенно лимитирует изучение и открытие новых МАГ [46]. В частности, несовпадение трансплантации по генам HLA-DR за счет иммунодоминантности ограничивает развитие иммунного ответа на более слабые антигены [85,86].

Биоинформатическое предсказание иммуногенности минорных антигенов также не отличается большой точностью. Полученные *in vitro* Т-клеточные клоны распознавали синтетические пептиды, соответствующие

предсказанным *in silico* минорным антигенам, однако клетки, обладающие гипотетически иммуногенными аллелями МАГ не были способны вызвать иммунный ответ. Исключение составил только известный антиген НА-1, показав свою иммуногенность [87]. Однако несмотря на сложности, поиск новых терапевтически релевантных МАГ остается актуальной задачей. Согласно оценке, фигурирующей в обзоре от одной из ведущих групп, изучающих МАГ, создание терапии, специфичной к 50 антигенам удовлетворит потребности в посттрансплантационной терапии одной трети всех алло-ТГСК [88].

1.4 Преимущества и недостатки МАГ как мишеней для иммунотерапии

Иммунный ответ на МАГ может быть использован как основа для специфичной терапии злокачественных новообразований крови, при которой РТПЛ не приводит к развитию РТПХ [29,37]. Этого можно добиться, используя МАГ, специфичные исключительно для клеток крови [89]. У этой гипотезы есть подтверждение: цитотоксические МАГ-специфичные CD8⁺ Т-клоны, выделенные из пациентов без РТПХ, не реагируют на клетки отличные от клеток крови, в отличие от клонов из пациентов с РТПХ [90]. Однако число специфичных для клеток крови МАГ невелико: в настоящее время обнаружено лишь 39 таких антигенов [91].

Благодаря нескольким особенностям, МАГ наиболее полезны именно в контексте иммунотерапии лейкозов [92]. Как известно, злокачественные новообразования крови обладают меньшей мутационной нагрузкой по сравнению с солидными опухолями, и существует необходимость в достаточно иммуногенной мишени для иммунотерапии именно злокачественных новообразований крови. [93]. В теории, МАГ должны быть более иммуногенны, чем опухлеассоциированные антигены (ОАА), представляющие собой аутологичные белки, поскольку МАГ никогда не встречались иммунной системе донора и не было отрицательного отбора Т-

клеточных клонов, с высокой аффинностью распознающих МАГ. Следовательно, уровень иммуногенности МАГ должен быть сравним с антигенами, впервые встречающимися иммунной системе: опухолевыми неоантигенами и вирусными антигенами. При этом МАГ обладают перед неоантигенами рядом преимуществ: поскольку МАГ происходят из генетического полиморфизма, изначально присутствующего во всех клетках организма, то этот полиморфизм будет и во всех субклонах опухоли. Кроме того, в отличие от большинства опухолевых неоантигенов, МАГ не являются уникальными для каждого пациента.

Генотипирование пар донор-реципиент на аллельные варианты МАГ не представляет большой сложности и может быть проведено на ПЦР-амплификаторе [94].

В то же время, у МАГ-специфичной терапии есть преимущество и перед терапией CAR-T, направленной на поверхностные антигены, в частности CD19 [95]. Так, CAR-T терапия эффективна в лечении В-клеточных лейкозов, однако побочный эффект в этом случае – полная потеря В-клеток, что делает пациента особенно чувствительным к инфекциям [96]. В целом, В-клеточный дефицит не является критическим для жизнедеятельности и может купироваться введением иммуноглобулиновых препаратов. Однако при миелоидных лейкозах, как упоминалось ранее, возникающая недостаточность миелоидного кроветворения ограничивает применение CAR-T бридж-терапией [11].

В отличие от CAR-T терапии, МАГ-специфичная терапия направлена не на конкретную клеточную популяцию, а на все клетки крови реципиента, при этом клетки крови донора, не имеющие МАГ, подвергаться уничтожению не будут. Следовательно, при МАГ-специфичной терапии донорское кроветворение будет сохранено в полном объеме.

Тем не менее, применение МАГ-специфичной терапии ограничено рамками HLA-совместимой ТГСК. В свою очередь, популяционная частота МАГ вносит ещё более существенные ограничения: иммуногенное

несовпадение, то есть, когда донор негативен по МАГ, а реципиент его имеет, наступает максимум в 25% трансплантаций, и оптимальная частота иммуногенного аллеля в популяции – 30% [66]. Лишь около десяти процентов МАГ имеют такую частоту.

Кроме того, нельзя забывать о способности опухоли уйти из-под иммунного надзора, утратив экспрессию молекул HLA, и МАГ-направленная терапия при утрате клетками опухоли HLA будет малоэффективна [97]. Таким образом, МАГ-специфичную терапию можно рассматривать как нишевую терапию злокачественных заболеваний крови, применимую только при определенных генотипах донора и реципиента. МАГ-специфичная может быть эффективно использована в тех случаях, когда применение других методов иммунотерапии невозможно или приводит к серьезным побочным эффектам.

1.5 Клинически перспективные МАГ

1.5.1 HA-1

Как было упомянуто ранее, HA-1 – один из наиболее иммуногенных МАГ, и потому изучен лучше всего. Он широко экспрессирован в клетках крови, включая клетки злокачественных новообразований [30,92]. Пептид HA-1H (VLHDDLLEA) – происходит из белка ГТФазы ARHGAP45, также известного как NMHA1. Аллельный вариант с аденозином в полиморфизме (rs1801284, база данных dbSNP), транслируется в гистидиновый остаток в третьей позиции пептида, и именно такой пептид способен связаться с молекулой HLA-A*02:01 [40]. Если индивид гомозиготен по гуаниновому варианту полиморфизма, то у него есть только пептид с аргинином в третьей позиции (HA-1R, VLRDDLLEA), и этот пептид не будет презентироваться из-за низкой аффинности связывания с молекулами HLA. Оба аллельных варианта пептида одинаково процессируются протеасомой и доставляются TAP-транспортером в ЭПР [98], однако аргининовый аллельный вариант пептида VLRDDLLEA значительно уступает в силе связывания с HLA по сравнению с гистидиновым вариантом VLHDDLLEA [69]. Аллель HLA-A*02:01 встречается у половины

людей в российской популяции, а полиморфизмы распределены имеют оптимальную для иммуногенного несовпадения частоту. Так, частота гомозигот по варианту rs1801284 A/A - 16%, гетерозигот - 36%, гомозигот по неиммуногенному варианту G/G - 48%. Применяв уравнение Харди-Вайнберга, получаем, что 52% популяции имеет хотя бы один иммуногенный аллель HA-1, а 48% – не имеет ни одного. Таким образом, каждая четвертая трансплантация будет не совпадать по антигену HA-1 [92].

Имеются противоречивые данные о взаимосвязи несовпадения трансплантации по HA-1 и развитии РТПХ: некоторые исследования проводят такую связь [14,99–102], другие такую связь отвергают [103–106]. HA-1-специфичные клоны детектируются в крови у трети HA-1-отрицательных реципиентов после трансплантации, несовместимой по HA-1 [54]. Однако не было найдено достоверной взаимосвязи между обнаружением HA-1 специфичных клонов донорского происхождения и развитием РТПХ [90,107].

Исследования на молекулярном уровне говорят в пользу безопасности HA-1: анализ экспрессионного профиля *ARHGAP45* в разных тканях показывает почти исключительную экспрессию клетках крови [30,108]. В функциональных *in vitro* тестах HA-1-специфичные Т-клеточные клоны не проявляли цитотоксической реакции на клетки из образцов биопсии кожи HA-1⁺ доноров [109] [110].

Таким образом, имеются весомые доказательства в пользу того, что сами по себе клетки негемопоезического происхождения не вызывают реакции HA-1-специфичных клонов. Наиболее вероятно, иммунный ответ в тканях направлен на клетки крови реципиента, после трансплантации не до конца замещенные клетками донора [92]. Поскольку для развития РТПХ необходим непосредственный контакт эффекторов и мишеней [111,112], находящиеся в тканях донорские HA-1-специфичные Т-лимфоциты, занятые уничтожением клеток крови реципиента, могут за счет воспалительных цитокинов запустить иммунную реакцию, затрагивающую всю ткань [113]. Учитывая это, инфузия донорских лимфоцитов, широко применяемая для индукции или поддержания

РТПЛ [114], проведенная непосредственно после трансплантации может оказаться рискованным терапевтическим решением, и более оптимальное время для инфузии - спустя несколько месяцев после ТГСК [115]. Меньший риск РТПХ при достаточном временном промежутке между ТГСК и инфузией донорских лимфоцитов действительно наблюдали как в мышинной модели [116], так и при клиническом применении инфузии [117].

В то же время, в крови пациентов без РТПХ также встречаются НА-1-специфичные Т-клоны, из чего можно сделать вывод, что одно лишь несовпадение донора и реципиента по НА-1 – недостаточное условие для возникновения РТПХ. Скорее всего, наибольшее влияние на развитие РТПХ оказывают цитокины воспаления, количество которых значительно повышено после трансплантации [118]. Таким образом, хотя несовпадение по НА-1 связано с риском развития РТПХ из-за уничтожения оставшихся в тканях клеток крови реципиента, этот риск можно значительно снизить, сделав временной промежуток между алло-ТГСК и инфузией лимфоцитов.

1.5.2 НА-2

Антиген НА-2 находится в числе первых открытых МАГ [45]. Пептид НА-2 является продуктом гена *MYO1G*, кодирующего миозин первого класса [119] и экспрессирующегося исключительно в клетках крови [109]. НА-2 относится к доминантно-рецессивным МАГ и имеет иммуногенный аллель $MYO1G^V$ (последовательность пептида YIGEVLVSV), соответствующий МАГ НА-2, и неиммуногенный $MYO1G^M$ (последовательность пептида YIGEVLVSM) [120]. Аминокислотная замена не влияет на аффинность связывания с HLA, а НА-2-специфичные клоны способны распознавать оба аллельных варианта синтетического пептида. Тем не менее, анализ фракции пептидов из HLA методом масс-спектрометрии не выявил эндогенно презентруемого пептида $MYO1G^M$ [120]. Наиболее вероятно, альтернативный аллельный вариант пептида не связывается с транспортером

ТАР или же протеасома расщепляет белок на пептиды неподходящей для презентации в HLA длины.

Пептид HA-2 презентуется в молекулах HLA-A*02, а частота иммуногенного аллеля в европейской популяции составляет 95% [109]. Из-за того, что иммуногенный аллель встречается у подавляющего большинства в европейской популяции, несовпадение по HA-1 при трансплантации происходит очень редко, и потому данных об иммунном ответе на HA-2 мало. По имеющейся информации, различие по МАГ HA-2 снижает риск рецидива заболевания и способствует РТПЛ [121]. При этом не была установлена связь HA-2 с РТПХ [106], а эксперименты *in vitro* демонстрируют реактивность HA-2-специфичных клонов только на клетки крови [110].

Несовпадение по HA-2 при алло-ТГСК может способствовать развитию РТПЛ при отсутствии РТПХ [107]. Группой исследователей, наблюдавших HA-2-специфичный иммунный ответ, были созданы трансгенных вирус-специфичные лимфоциты, модифицированные ТКР, распознающим HA-2 [122]. Аминокислотную последовательность CDR3 HA-2-специфичного ТКР было решено изменить для увеличения аффинности. Однако изменение аминокислотной последовательности CDR3 привело к возникновению кросскреактивности HA2-специфичного ТКР на пептиды, присутствующие на фибробластах и кератиноцитах, поэтому такой модифицированный ТКР не может быть использован в терапии [123].

Иммуногенное несовпадение пары донор-реципиент по HA-2 в европейской популяции происходит редко, поэтому в настоящее время HA-2-специфичная терапия находится лишь в стадии *in vitro* разработки. Однако это означает, что MYO1G^V может быть универсальной мишенью при гаплосовместимой трансплантации, то есть, когда нет полного совпадения по аллелям HLA. В таком случае, если донор отрицателен по аллелю HLA-A*02:01, а у реципиента этот аллель есть, HA-2 может служить маркером клеток крови реципиента, которые необходимо уничтожить. Однако в

популяциях, отличных от европейской, аллельная частота HLA-2 другая и может быть оптимальна для терапевтического использования HLA-2 при полностью HLA-совместимой алло-ТГСК [124,125].

1.5.3 ACC1/2

Ген *BCL2A1* входит в состав семейства антиапоптотических генов Bcl-2. Сразу два МАГ происходят из этого гена: ACC-1Y и ACC-2D, и презентруются эти МАГ соответственно в молекулах HLA аллелей A*24:02 и B*44:03 [126]. Антиапоптотический ген *BCL2A1* часто гиперэкспрессирован в клетках рака и необходим для выживания, поэтому маловероятно что злокачественные клетки смогут подавить экспрессию *BCL2A1* для ухода от иммунного ответа [31,127]. Разберем механизмы образования антигенов ACC-1 и ACC-2.

ACC-1 связан с полиморфизмом rs1138357 и имеет два аллельных варианта пептида: ACC-1Y (последовательность пептида DYLYQYVLQI) и ACC-1C (последовательность пептида DYLYQCVLQI). Оба этих пептида связываются с молекулами HLA-A*24:02, и доказано, что МАГ ACC1 является кодоминантным [126].

Связанный с полиморфизмом rs3826007 МАН ACC-2, напротив, образуется по доминантно-рецессивному механизму. Только один аллельный вариант пептида KEFEDDIIINW связывается с HLA-B*44:03 [126]. В рамках выполнения настоящей диссертации был получен и охарактеризован *in vitro* ТКР, распознающий МАГ ACC-1Y, были исследованы его функциональные качества и показано отсутствие кроссреактивного ответа на альтернативный аллельный вариант пептида [128]. Специфичные к ACC-2 Т-клеточные клоны пока не охарактеризованы в научной литературе.

Учитывая популяционную частоту аллелей HLA-A*24:02 и HLA-B*44:03, а также частоты аллелей МАГ ACC-1 и ACC-2, оценка вероятности иммуногенного несовпадения при родственной и неродственной трансплантации оценивается как 2,8 и 5,2% для ACC-1, и 3,6 и 6,7% для ACC-

2 соответственно, что делает разработку АСС-специфичной терапии достаточно перспективной [129].

Большинство свидетельств указывают на экспрессию *BCL2A1* исключительно в клетках крови [126,130]. Экспрессия *BCL2A1* в мезенхимных стромальных клетках обнаруживалась только под воздействием гамма-интерферона и фактора некроза опухоли и в физиологических условиях скорее всего не происходит [131]. В пользу безопасности АСС-1 как мишени иммунотерапии говорит и анализ исходов 320 совместимых по HLA-A*24:02 трансплантаций, не нашедший связи между несовпадением АСС-1 и развитием РТПХ [132].

Т-клеточные клоны, специфичные к АСС-1 и АСС-2, способны уничтожать клетки крови реципиентов ТГСК, что было подтверждено *in vitro* [126]. Также эти клоны обнаруживались в организме реципиентов, перенесших МАГ-несовместимую трансплантацию, и эти клоны действительно были способны убивать позитивные по АСС-1Y клетки, что свидетельствует об иммуногенности АСС-1Y [133].

1.6 Клинические исследования МАГ-специфичной терапии

Простейший способ иммунотерапии после ТГСК – дополнительное переливание лимфоцитов донора. Переливание имеет целью не только профилактику и терапию рецидивов злокачественного заболевания [114], но и снижение риска развития оппортунистических инфекций, вызванных лимфопенией, обусловленной кондиционированием [134]. Значительная роль в индукции РТПЛ при инфузии донорских лимфоцитов принадлежит иммунному ответу на МАГ [107]. Свидетельства в пользу этой гипотезы были получены на мышинной модели [135]: адоптивный перенос Т-киллеров из мышей, предварительно иммунизированных мышиным МАГ B6dom1, способствовал значительно лучшей выживаемости реципиентов, которым вводили клетки Т-лейкоза линии EL4. Полученные при иммунизации Т-

клеточные клоны после адоптивного переноса проявляли выраженную противоопухолевую активность, РТПХ при этом не наблюдалась.

Роль иммунного ответа на МАГ при инфузии донорских лимфоцитов была подтверждена и в клинике: адоптивный перенос лимфоцитов от НА-1 и/или НА-2 отрицательных доноров НА-1 и/или НА-2 позитивным реципиентам с рецидивом лейкоза привел к полной ремиссии у реципиентов [107]. Выделенные из реципиентов донорские МАГ-специфичные демонстрировали специфическую противоопухолевую активность *in vitro* [136].

МАГ-специфичные клоны присутствуют в крови в довольно небольшом количестве: частота наивных клонов оценивается как $2,47 \cdot 10^{-6}$ [137]. Увеличить количество терапевтического материала можно путем экспансии Т-клеток: лимфоциты донора *ex vivo* опухолевых клеток пациентов, в результате чего пролиферируют Т-клеточные клоны, распознающие антигены, представленные на опухолевых клетках. Такой подход показал умеренную эффективность в клинических испытаниях [138]. Антигенная специфичность клонов в этих экспансиях осталась неизученной, однако авторы предполагают ведущую роль МАГ в терапевтическом ответе.

Описан и другой пример применения МАГ-специфических экспансий у семи пациентов с рецидивом В-клеточного ОЛЛ или миелодиспластическим синдромом [139]. В этой работе, лимфоциты пациентов после трансплантации, уже имеющие в основном донорское происхождение, *in vitro* несколько раз стимулировали клеточным материалом этих же пациентов, но собранным до трансплантации. Инфузия полученных экспансий в реципиентов привела к временной ремиссии у 5 из 7 реципиентов. У двоих пациентов с ремиссией возникла РТПХ в легких. У троих пациентов были определены гены, на МАГ из которых был направлен иммунный ответ: *P2RX7*, *DPH1*, *DDX3Y*.

Известны и случаи клинического применения НА-1-специфических экспансий [140]. Трем пациентам с рецидивом лейкоза, для которых обычная инфузия донорских лимфоцитов не имела терапевтического эффекта, было

решено ввести специфичные к НА-1 Т-клеточные экспансии, однако ни РТПХ, ни РТПЛ не наблюдалась. Скорее всего, терапевтическая эффективность была снижена из-за неоптимальных условий культивирования, что привело к истощению культуры уже на стадии *in vitro*, и как следствие, жизнеспособность НА-1-специфичных клеток в организме пациента была низкой. В дальнейшем, такой подход может быть использован более эффективно путем предотвращения истощения лимфоцитов при культивировании за счет добавления цитокинов IL-7 и IL-15 [141] или блокады Akt/PKB пути [142].

Терапевтический эффект переливания донорских лимфоцитов можно попытаться усилить параллельным введением дендритно-клеточной вакцины на МАГ. Позитивный эффект был показан на пациентах с персистирующей и множественной миеломой, в том числе и с рецидивирующим после алло-ТГСК заболеванием [143]. В другом исследовании вакцина способствовала ремиссии у одного из четырех пациентов [144]. Несмотря на несколько случаев ответа и относительную безопасность, эффективность дендритно-клеточных вакцин в целом остается под вопросом [145].

Таким образом, наиболее перспективным из методов создания специфичных к МАГ терапевтических продуктов считается модификация донорских лимфоцитов трансгенным МАГ-специфичным ТКР. Этот метод имеет значительное преимущество перед антиген-специфичными экспансиями, поскольку изоляция МАГ-специфичных клонов, их *in vitro* тестирование и культивирование перед инфузией – длительный процесс, и можно значительно сэкономить время, проведя модификацию донорских лимфоцитов трансгенным ТКР с уже известными характеристиками.

В одной из первых работ по созданию НА-1-специфичной Т-клеточной терапии, трансгенным НА-1-специфичным ТКР были модифицированы Т-клетки памяти, специфичные к вирусным антигенам. Теоретически, вторая специфичность Т-клеток должна способствовать их лучшей персистенции в организме параллельно с контролем посттрансплантационной

цитомегаловирусной инфекции. Кроме того, вирусная специфичность ТКР в теории должна снизить вероятность аллореактивного ответа Т-лимфоцитов и развития РТПХ [146]. Трансгенные лимфоциты показали хорошую эффективность и специфичность в лизисе опухолевых клеток *in vitro* [147]. Однако первая фаза клинических испытаний не принесла желаемого результата [148]. Из девяти пациентов с рецидивом ОМЛ после алло-ТГСК лишь для пяти можно было сделать клеточный продукт, поскольку остальные пациенты не болели цитомегаловирусом или вирусом Эпштейна-Барр. Состав клеточного продукта сильно варьировал: пациентам вводили от 3 до $283 \cdot 10^6$ клеток, из них Т-клеток было 96–99%, вирус-специфичными были 74–100%, а трансгенный ТКР экспрессировали 11–41%. В результате, из пяти пациентов, получивших инфузию, один скончался от рецидива ОМЛ, а двое от сопутствующих осложнений или инфекции. У двоих выживших пациентов признаков РТПХ не наблюдалось. В контрольной группе один пациент умер от бактериальной инфекции.

Результаты этих испытаний указывают на низкую терапевтическую эффективность метода модификации вирус-специфичных лимфоцитов. Поскольку *in vitro* модифицированные лимфоциты проявляли противоопухолевую активность, причем в отношении клеток рака этих же пациентов, отобранных до и после адоптивного переноса, то неэффективность терапии не могла объясняться потерей опухолевыми клетками антигена НА-1 или HLA. Наиболее вероятная причина – низкий пролиферативный потенциал вирус-специфичных лимфоцитов, и вследствие этого недостаточное количество трансгенных клеток в организме для борьбы с заболеванием. Как известно, пролиферативный потенциал клеток памяти меньше, чем у наивных [149]. По задумке авторов, эта проблема должна решаться постоянным сигналом активации от вирус-специфичного ТКР. Тем не менее, эндогенный вирус-специфичный ТКР не экспрессировался на достаточном уровне из-за того, что трансгенный ТКР был кодон-оптимизирован для более эффективной трансляции и тем самым количество молекул трансгенного ТКР в комплексе с

CD3 значительно превосходило количество молекул эндогенного ТКР. Недостатком метода модификации вирус-специфичных лимфоцитов является также сложность внедрения этого метода в массовое производство из-за малой частоты вирус-специфичных клеток памяти (около процента от всех Т-лимфоцитов [150]).

**Таблица 1 Клинические исследования с использованием МАГ.
Опубликовано в работе [70]**

Публикация/номер клин. исследования	Антигены	Метод получения клеточного продукта	Кол-во пациентов	Результат	Диагноз пациентов
[107]	HA-1, HA-2, Y-хромосомные антигены	Инфузия донорских лимфоцитов	3	Ремиссия	Рецидив ОМЛ
NCT00107354 [139]	P2RX7 DPH1 DDX3Y	Экспансия донорских Т-лимфоцитов ex vivo	7	Транзиентная ремиссия у 5 пациентов	Рецидив ОМЛ
[140]	HA-1	Экспансия донорских Т-лимфоцитов ex vivo	3	Нет клинического ответа	Рецидив ОМЛ
[143]	LRH-1 UTA2-1 HA-1	Инфузия донорских лимфоцитов и пептидная дендритноклеточная вакцина	9	У 5 пациентов детектировались МАГ-специфичные лимфоциты и замедлилось развитие болезни	Рецидив ММ и персистирующая ММ
[144]	HA-1, HA-2, ACC1	Инфузия донорских лимфоцитов и пептидная дендритноклеточная вакцина	15	Ремиссия у одного пациента, хроническое заболевание/прогрессия у остальных	ММ
NCT04464889 [148]	HA-1	Трансдукция вирус-специфичных лимфоцитов	9	Нет клинического ответа, смерть одного пациента от рецидива ОМЛ	Рецидив ОМЛ
NCT03326921 [151]	HA-1	Трансдукция донорских CD4 и CD8 ⁺ лимфоцитов	Набор пациентов	-	-

NCT03091933	Не разглашается	Экспансия	20	Умеренный клинический ответ: остановка прогрессии заболевания у части пациентов, признаки РТПХ	Рецидив лейкемии Рецидив ОЛЛ Рецидив ОМЛ Рецидив хронического лимфобластного лейкоза (ХЛЛ) Рецидив неходжкинской лимфомы Рецидив лимфомы Ходжкина Рецидивирующие миелодиспластические синдромы Рецидив ММ
2018-002752-33	УТА2-1	мРНК дендритноклеточная вакцина с сайленсингом PD1-L РНК-интерференцией	Набор пациентов	-	ММ Неходжкинская лимфома ХЛЛ ОМЛ
2012-002435-28	Не разглашается	мРНК дендритноклеточная вакцина с сайленсингом PD1-L РНК-интерференцией	Набор пациентов	-	Неходжкинская лимфома Ходжкинская миелома ХЛЛ Хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ) ОМЛ Миелодисплазия
NCT02528682	HA-1 LRH-1 ARHGDIВ	мРНК дендритноклеточная вакцина с сайленсингом PD1-L РНК-интерференцией	10	Испытания завершены, результаты еще не опубликованы	ОМЛ Миелодисплазия ОЛЛ ХМЛ ХЛЛ ММ Неходжкинская лимфома

Другой подход к получению клеточного продукта, напротив, предполагает модификацию трансгенным HA-1-специфичным ТКР наибольшего количества Т-лимфоцитов, в том числе и Т-хелперов [151]. Для функционирования трансгенных CD4⁺ клеток в лентивирусном конструкторе

присутствует корецептор CD8. В качестве селективного маркера для очищения модифицированных клеток используется укороченная молекула CD34. В конструкторе также предусмотрена система контролируемого апоптоза трансгенных клеток, использующая индуцибельную каспазу iCasp9. Этот клеточный продукт планируется испытать в первой фазе клинического исследования (NCT03326921).

Клинические исследования с использованием МАГ приведены в таблице 1. Невелико как число исследований, так и пациентов в каждом исследовании. Это объясняется тем, что, во-первых, при трансплантациях редко генотипируют донора и реципиента на минорные антигены, а во-вторых, как уже упоминалось ранее, иммуногенное несовпадение по МАГ происходит максимум в 25% всех трансплантаций [152].

1.7 МАГ-специфичная терапия в контексте Т-клеточных терапий

Химерный антигенный рецептор (CAR) изначально создавался как исключительно научная разработка для изучения фундаментальных принципов Т-клеточного распознавания, [153] но на настоящий момент число разрабатываемых CAR-T терапий превышает 600 [154], а шесть препаратов CAR-T получили одобрение управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) [155]. CAR-T разрабатываются более чем на 80 молекул-мишеней [95]. Внедрение Т-клеточных терапий с трансгенным ТКР значительно отстает от CAR-T: проводятся около 100 клинических испытаний терапий на основе лимфоцитов с трансгенным ТКР, большинство которых находятся в первой или второй фазе. Также, в клинических испытаниях фигурируют всего 19 Т-клеточных антигенов, один из которых – HA-1 [156,157].

Однако если основная ниша CAR-T – это лечение злокачественных заболеваний крови, то терапия солидных опухолей занимает небольшой процент от всех разрабатываемых CAR-T терапий [158]. В то же время, примерно половина терапий с трансгенным ТКР разрабатывается для лечения

солидных опухолей. Также, по сравнению с CAR-T, более разнообразны классы антигенов – если мишени CAR-T терапии это в основном опухолеассоциированные антигены, то ТКР-терапия создается ещё и на опухолевые неоантигены и вирусные антигены [156,157]. Минорные антигены гистосовместимости можно отнести к опухолеассоциированным антигенам, и МАГ-специфичные терапии занимают очень небольшую нишу по сравнению с терапиями на более известные антигены, например NY-ESO1. Можно также утверждать, что применимость МАГ-специфичных терапий принципиально ограничивается лишь гематологическими заболеваниями, поскольку использовать МАГ возможно лишь в контексте алло-ТГСК.

Терапия с использованием МАГ-специфичных трансгенных ТКР сталкивается со сложностями, присущими всем терапиям с трансгенным ТКР. В частности, при модификации Т-клеток трансгенным ТКР, нативные и трансгенные субъединицы ТКР могут образовывать гетеродимеры, в которых одна субъединица имеет эндогенное происхождение, а другая - трансгенное. Возникающие таким образом ТКР обладают новой неизвестной специфичностью и не подвергались отрицательному отбору в тимусе, а потому несут риск аутореактивности [159]. Решить эту проблему можно генетическим редактированием, например с помощью системы CRISPR/Cas9 нокаутировать гены, кодирующие нативный ТКР [160]. Схема МАГ-специфичной терапии с шагом генетического редактирования представлена на рисунке 2. После алло-ТГСК, из донора выделяют CD8⁺ Т-лимфоциты, модифицируют трансгенным МАГ-специфичным ТКР посредством лентивирусной трансдукции, проводят CRISPR/Cas нокаут эндогенного ТКР и после дополнительной *ex vivo* культивации, вводят клеточный продукт реципиенту.

МАГ-специфичная иммунотерапия может быть реализована не только с помощью лимфоцитов, несущих ТКР: к примеру, был создан CAR, специфичный к HA-1 [161]. Хотя у такого подхода те же ограничения в парах донор-реципиент, что и у МАГ-специфичной ТКР-терапии, использование

CAR позволяет несколько упростить процедуру производства, пропуская нокаут эндогенного ТКР.

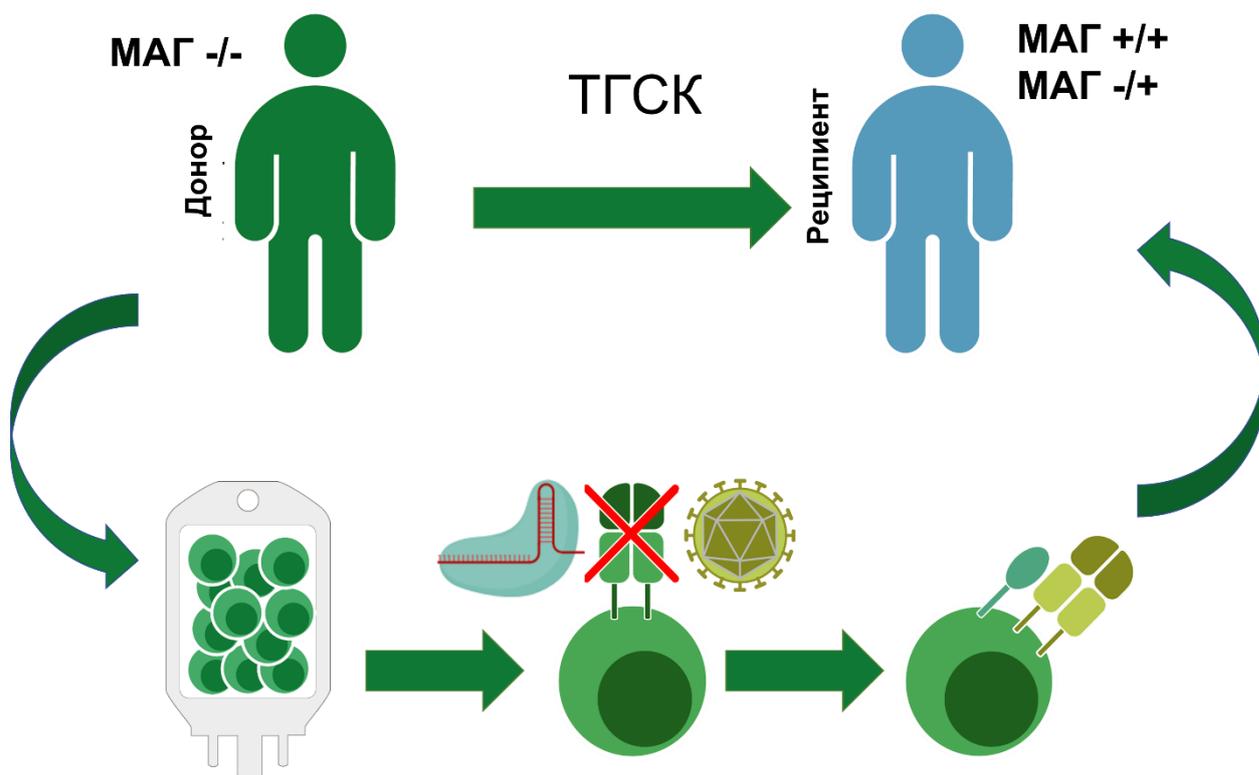


Рисунок 2. Схема МАГ-специфичной терапии и профилактики лейкозов после ТГСК. После проведенной алло-ТГСК, из донора, не имеющего МАГ выделяют и активируют Т-лимфоциты. С помощью CRISPR/Cas проводят нокаут эндогенного ТКР, и одновременно проводят модификацию трансгенным ТКР с помощью лентивирусной трансдукции. После *ex vivo* культивации, лимфоциты вводят реципиенту. Опубликовано в работе [68]

1.8 Заключение

Таким образом, МАГ-специфичная терапия призвана усилить эффект алло-ТГСК, способствуя РТПЛ при уменьшенном риске РПТХ благодаря использованию тканеспецифичных МАГ.

Развитие методов клеточной терапии и удешевление её стоимости несомненно будет способствовать и успеху МАГ-специфичной терапии. Эффективность терапии можно повысить за счет оптимизации способа экспансии Т-клеток. Также предпочтительно использовать клетки с большим пролиферативным потенциалом, например популяции наивных Т-клеток [162] и стволовых Т-клеток памяти [163]. Не вполне удачные испытания Т-клеточной терапии [148] и большой пласт опыта, накопленный при применении CAR-T, должны послужить уроком для дальнейшего развития Т-

клеточной терапии. Получение трансгенных МАГ-специфичных лимфоцитов - более перспективный метод, чем антиген-специфические экспансии, поскольку получаемый клеточный продукт может быть стандартизирован.

Поиск донора с иммуногенным несоответствием накладывает ограничения на применение МАГ-специфичной терапии, однако терапия может быть применена и при гаплоидентичной трансплантации, что расширяет ее применимость в клинике.

Нами была поставлена цель разработать метод получения ТКР, специфичных к клинически перспективным МАГ НА-1 и АСС-1У.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение антиген-специфичных Т-клеточных экспансий

Образцы крови были взяты у здоровых доноров, подписавших добровольное информированное согласие. Данные HLA-типирования доноров были взяты из донорской базы ФГБУ НМИЦ Гематологии. Тестирование на полиморфизмы в генах *BCL2A1* и *ARHGAP45* было проведено в соответствии с опубликованным протоколом [94]. Из 30 мл крови здоровых доноров с помощью центрифугирования на градиенте фикола (Панэко, Россия) выделяли фракцию периферических мононуклеаров, затем из этой фракции с помощью иммуномагнитной сепарации выделяли CD14⁺ лейкоциты (набор производства Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Выделенную фракцию CD14⁺ клеток (приблизительно 3-5*10⁷ клеток) переносили в культуральный флакон T25 с адгезивным покрытием (Sarstedt, Германия) и добавляли 5 мл полной среды RPMI (Gibco, Великобритания) с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone™, GE Healthcare, США) и 1% раствором пенициллина и стрептомицина (Gibco, Великобритания). Далее под полной средой будет иметься в виду среда с 10% содержанием ФБС и антибиотиком. Клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 4 ч, после чего удаляли среду с неприкрепленными клетками. Во флакон, содержащий прикрепленные к поверхности пластика

моноциты, добавляли 5 мл полной среды RPMI с 800 ед./мл GM-CSF, 10 нг/мл IL-4, 10 нг/мл липополисахарида и 100 ед./мл интерферона-гамма (IFN- γ) (все цитокины производства Miltenyi Biotec, Германия) и культивировали в течение 3 дней в CO₂ инкубаторе при 37°C. Полученные в результате дифференцировки дендритные клетки удаляли с пластика скребком, после чего 50 минут облучали на аппарате Biobeam GM8000 (Gamma-Service Medical, Германия) до общей дозы облучения 50 Гр.

В тот же день, из 50 мл свежей крови того же донора выделяли фракцию периферических мононуклеаров, затем из этой фракции с помощью иммуномагнитной сепарации выделяли наивные CD8⁺ Т-лимфоциты в соответствии с протоколом производителя (Miltenyi Biotec, Германия) [164]. Затем выделенные наивные CD8⁺ Т-лимфоциты рассеивали в 48-ячеечный планшет (Sarstedt, Германия) в плотности от 2*10⁵ до 1*10⁶ CD8⁺ наивных Т-клеток на одну ячейку в полной среде RPMI и 30 нг/мл IL-21. В ячейки к CD8⁺ Т-клеткам добавляли облученные аутологичные дендритные клетки с добавлением синтетического целевого пептида (HA-1 или ACC-1Y) до конечной концентрации 5000 нг/мл (4.88 нмоль/мл) (производитель LifeTein, США). Делали также контрольные экспансии, в которых ДК презентировали альтернативные аллельные варианты пептидов, HA-1-H и ACC-1C соответственно. Пропорция Т-клеток и дендритных клеток составляла 2:1 или 4:1 [164]. На третий, пятый и седьмой дни культивации добавляли до конечной концентрации 5 нг/мл цитокины IL-7, IL-21 и IL-15, суммарно экспансию CD8⁺ Т-клеток проводили 10 дней.

В случаях, когда ДК и CD8⁺Т-клетки происходили от разных доноров, использовали тот же протокол экспансии. В этих аллогенных HA-1-специфичных экспансиях донор дендритных клеток имел аллель HLA-A*02, а донор Т-клеток, наоборот, был отрицателен по HLA-A*02.

2.2 Получение лимфобластоидных клеточных линий в качестве антигенпрезентирующих клеток.

В-лимфобластоидные клеточные линии (В-ЛКЛ) были получены следующим образом: периферические мононуклеары здоровых доноров, полученные центрифугированием цельной крови на градиенте фиколла как описано ранее, в количестве $3-5 \cdot 10^6$ клеток переносили в флакон Т25 и заражали 3 мл среды, содержащей вирус Эпштейна-Барр в титре приблизительно миллион инфекционных частиц на мл. Клетки с вирусными частицами инкубировали в CO_2 -инкубаторе сутки, после чего к суспензии добавляли среду RPMI с 20% ФБС, антибиотиком и 200 нг/мл циклоспорина А (Sigma, Германия). После двух недель культивации клетки переносили в среду того же состава, но с 10% ФБС. Полученные клеточные линии подвергали криоконсервации.

2.3 Окраска HLA-тетрамерами.

HLA-тетрамеры были получены по протоколу: 200 нг биотинилированных HLA-мономеров добавляли к 200 нг стрептавидин-фикоэритрина (PE) или стрептавидин-аллофикоцианина (APC) (Thermo Fisher Scientific, США), объем смеси доводили до 10 мкл буфером IS (IBA Biosciences, Германия), и инкубировали 45 минут на льду в темноте [165]. Для подготовки к цитометрическому анализу, клеточный осадок, содержащий приблизительно $5 \cdot 10^5$ лимфоцитов, ресуспендировали в 20 мкл раствора тетрамеров в буфере IS и инкубировали в течение 30 минут при 37°C в темноте. Для дальнейшего окрашивания антителами, добавляли 50 мкл буфера со смесью антител и инкубировали ещё 15 минут в тех же условиях. Для цитометрического анализа использовали проточный цитофлуориметр BD FACSCanto™ II.

2.4 Изучение эффекторных качеств CD8^+ Т-клеточного клона, специфичного к АСС-1У, методами внутриклеточной окраски на IFN- γ и подсчета процента гибели клеток-мишеней

Отбирали $1,5 \cdot 10^5$ клеток из культуры CD8^+ Т-клеточного клона, распознающего минорный антиген АСС-1У, и растворяли в 100 мкл полной

среды RPMI в 1.5 мл пробирке. В эту же пробирку добавляли 100 мкл среды с $3 \cdot 10^4$ клеток В-ЛКЛ, позитивных по аллелю HLA-A*24, предварительно культивированных в течении 1 ч в полной среде RPMI с 10 мМ синтетического пептида ACC-1Y в 96-ячеечном планшете. Содержимое пробирки перемешивали пипетированием и переносили пробирку с клетками в CO₂ инкубатор. После 4-часовой выдержки в CO₂ инкубаторе, к клеткам добавляли пропидий-йодид (BD Biosciences, США) в концентрации 2 мкг/мл и аннексин V-FITC (BD Biosciences, США) в количестве 2 мкл на пробу, и инкубировали в аннексин-связывающем буфере 15 минут в темноте на льду, после чего сразу приступали к цитометрическому анализу.

Для внутриклеточного окрашивания на IFN- γ , после 4 часов инкубации эффекторов и мишеней как описано выше, клетки осаждали центрифугированием и добавляли 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего бычий сывороточный альбумин (БСА) и этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), содержащего флуоресцентно меченые анти-CD3 антитела (Mouse IgG2a, κ , клон ОКТ3, Alexa Fluor 700, Sony, Япония) и окрашивали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Далее клетки промывали буфером ФСБ/БСА/ЭДТА и проводили фиксацию и пермеабелизацию, добавляя 250 мкл содержащего формальдегид однократного раствора BD Cytoperm (BD Biosciences, США) и инкубируя в течение 20 минут на льду. Далее осадок промывали раствором Perm/Wash (BD Biosciences, США), и добавляли 100 мкл раствора 1X BD Cytoperm, содержащего 0,2 мкл флуоресцентно меченных анти-IFN γ антител (IgG1, κ , клон B27, APC, BD Biosciences, США). Окраску проводили при 4 °C в течение 30 минут в темноте. Затем осадок промывали два раза раствором Perm/Wash, растворяли в 250 мкл буфера ФСБ/БСА/ЭДТА и приступали к цитометрическому анализу.

2.6 Внеклеточное окрашивание на γ -интерферон

Для изучения функциональности трансгенных АСС-1У-специфичных лимфоцитов был применен несколько другой метод, а именно внеклеточное окрашивание на IFN- γ . 10^6 лимфоцитов из трансдуцированной трансгенным ТКР культуры стимулировали $5 \cdot 10^5$ облученных дозой 50 Гр клеток В-ЛКЛ, позитивных по HLA-A*24 и имеющих генотип АСС-1^{C/C}, то есть отрицательных по МАГ АСС-1У. В экспериментальные образцы добавляли пептид АСС-1У до концентрации 5000 нг/мл, в образцы отрицательного контроля пептид не добавляли. Лимфоциты культивировали с В-ЛКЛ в течение 16 ч в 1 мл среды RPMI с 10% сыворотки крови человека, антибиотиком и 10 U/мл IL-2 в 24-ячеечной планшете. После стимуляции клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 300 g, промывали холодным буфером ФСБ/БСА/ЭДТА и ресуспендировали в 90 мкл холодной среды RPMI, содержащей 10% сыворотки крови человека. Затем добавляли 10 мкл реагента для улавливания IFN- γ (Miltenyi Biotec, Германия) и инкубировали на льду в течение 5 мин. Затем добавляли 1 мл теплой среды RPMI с 10% сыворотки человека, переносили пробирку в CO₂ инкубатор и инкубировали при 37°C и постоянном перемешивании в течение 45 минут. За это время интерферон, секретируемый клетками, связывается с биспецифичными антителами на поверхности клеток, входящими в состав интерферон-связывающего реагента. Далее клетки промывали холодным буфером ФСБ/БСА/ЭДТА и осаждали центрифугированием при 4°C. Осадок ресуспендировали в 90 мкл буфера; затем добавляли 10 мкл антител, меченных флуоресцентным красителем APC (Miltenyi Biotec, Германия) и специфичных к IFN- γ . В результате окрашивались клетки, продуцировавшие интерферон. Инкубацию с антителом к IFN- γ проводили на льду в течение 10 мин, после чего промывали буфером. Далее сразу приступали к анализу клеток-продуцентов интерферона методом проточной цитофлуориметрии.

2.7 Секвенирование генов α и β субъединиц Т-клеточного рецептора, специфичного к АСС-1У

Экспансии Т-клеток на антиген АСС-1У получали методом, описанным в параграфе 2.1. Затем из культур выделяли лимфоциты, распознающие пептид АСС-1У следующим образом: клетки обрабатывали биотинилированным комплексом тетрамеров молекул HLA-A*24 с пептидом АСС-1У, аналогично процессу, описанному в пункте 2.3, с увеличением объемов кратно количеству клеток. Далее с помощью покрытых стрептавидином магнитных микрочастиц (IBA Lifesciences, Германия) выделяли только клетки, связавшиеся с тетрамером. Из очищенной таким образом фракции АСС1У-специфичных лимфоцитов выделяли РНК с помощью TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Из выделенной РНК с помощью ревертазы MINT (Евроген, Россия) синтезировали первую цепь ДНК α и β субъединиц ТКР, используя опубликованные ранее праймеры, специфичные к С-регионам субъединиц [166]. Затем проводили две последовательные амплификации в соответствии с протоколом производителя MINT, после чего ПЦР-продукт анализировали электрофорезом в агарозном геле, вырезали из геля и очищали с использованием набора для очистки ПЦР продукта из геля (Евроген, Россия). Очищенный ПЦР-продукт, содержащий нуклеотидные последовательности α и β субъединиц ТКР, лигировали в вектор pAL2-T (Евроген, Россия). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* (штамм DH5 α), ПЦР-скринингом определяли колонии со вставкой нужной длины. Отобранные колонии бактерий наращивали, выделяли из них плазмидную ДНК с помощью набора (Евроген, Россия), и секвенировали плазмиды методом Сэнгера. Для разметки нуклеотидных последовательностей генов ТКР использовали программу ImMunoGeneTics (<http://www.imgt.org/>).

2.8 Клонирование генов α и β субъединиц Т-клеточного рецептора, специфичного к АСС-1У в лентивирусный вектор

Последовательности α и β субъединиц АСС-1У-специфичного ТКР переносили в экспрессионный лентивирусный вектор Plenti6/V5-DEST (Invitrogen, США). Нуклеотидные последовательности α и β субъединиц ТКР

находятся на одной мРНК, экспрессирующей с промотора цитомегаловируса. Белковые субъединицы ТКР при трансляции разделяются между собой 2А пептидом: синтез белковой цепи прерывается между 19 и 20 аминокислотами 2А пептида, и одна белковая цепь освобождается с 19 аминокислотами 2А пептида, а рибосома продолжает синтез с этого места. Таким образом, с одной мРНК получаются два белка примерно в эквимолярном соотношении.

2.9 Поиск нуклеотидных последовательностей субъединиц ТКР, предположительно специфичных к НА-1

Используемый нами метод поиска ТКР, потенциально специфичных к НА-1, основан на определении последовательностей α и β субъединиц ТКР, статистически достоверно более часто встреченных в антиген-специфичной фракции лимфоцитов Т-клеточной экспансии. Для выделения антиген-специфичной фракции использовали два метода: выделение с помощью тетрамеров или антиген-специфичную рестимуляцию. В таблице 1 приложения указано, каким образом происходила сепарация для экспансий из разных доноров.

При выделении с помощью тетрамеров, клетки обрабатывали биотинилированным комплексом тетрамеров молекул HLA-A*24 с пептидом АСС-1У, аналогично процессу, описанному в пункте 2.3, с увеличением объемов кратно количеству клеток. Далее с помощью покрытых стрептавидином магнитных микрочастиц (IBA Lifesciences, Германия) на магнитной колонке выделяли клетки, связавшиеся с тетрамером. Не связавшиеся с колонкой клетки также собирали для дальнейшего выделения РНК.

Процесс выделения антиген-специфических клеток за маркер активации CD137 описан на рисунке 3. Рестимуляцию лимфоцитов проводили следующим образом: в ячейку 24-ячеечного планшета, содержащую 1 мл среды RPMI с 10% сыворотки человека, переносили 10^6 лимфоцитов и $5 \cdot 10^5$

облученных дозой 50 Гр клеток В-ЛКЛ. В экспериментальные образцы добавляли пептид HA-1 до концентрации 5000 нг/мл, в образцы отрицательного контроля пептид не добавляли. Лимфоциты культивировали с В-ЛКЛ в течение 16ч в CO₂ инкубаторе. Часть образца использовали для оценки экспрессии CD137 на проточном цитофлуориметре. Далее для выделения позитивных по CD137 клеток использовали иммуномагнитную сепарацию.

Из фракции, обогащённой магнитной сепарацией, а также из остальных лимфоцитов выделяли РНК с помощью TRIzol. Далее проводили анализ репертуаров ТКР в исследуемых образцах методом высокопроизводительного секвенирования.

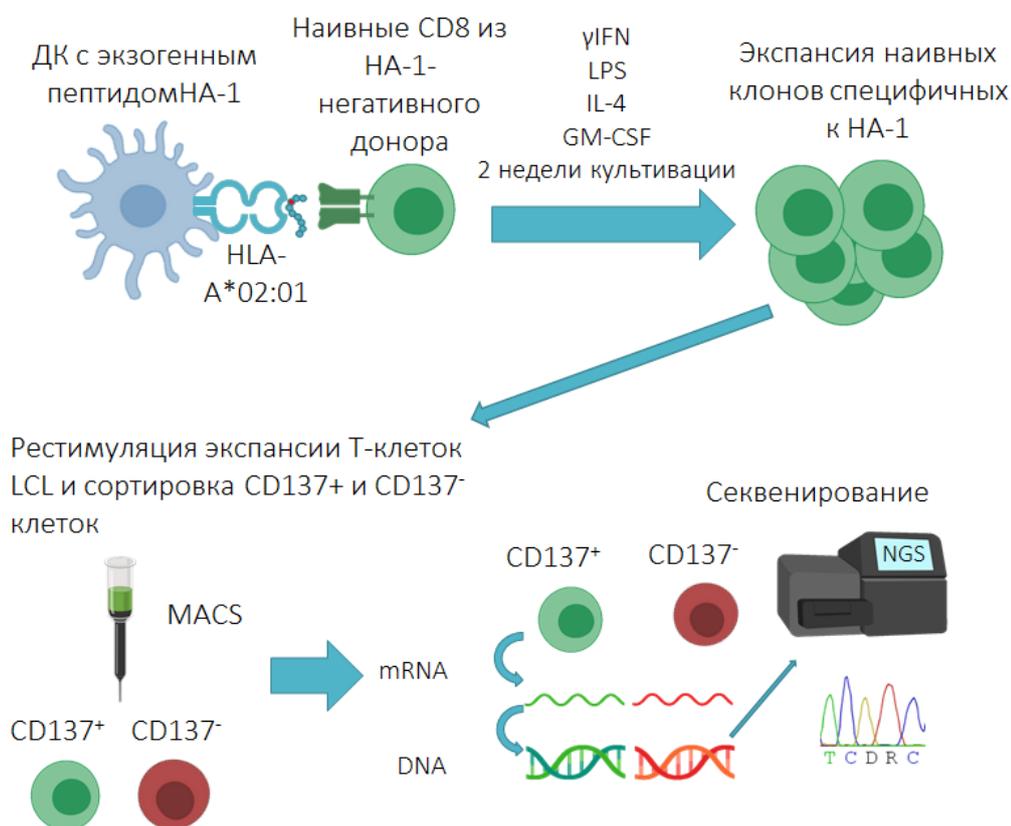


Рисунок 3. Схема получения репертуара ТКР специфичных к HA-1 с использованием CD137 как маркера антиген-специфичной фракции.

Нами был применен метод изучения репертуаров ТКР, использующий РНК в качестве исходной матрицы (рис.4) [167]. Реакцию проводили отдельно для α и β субъединиц ТКР из каждой экспансии. Праймеры, специфичные к С-

регионам генов субъединиц ТКР, запускают реакцию обратной транскрипции, которая проходит по методу быстрой амплификации 5'-концевых комплементарных концов ДНК (5'RACE). Этот метод основан на терминальной трансферазной активности фермента обратной транскриптазы (Takara, Япония), который включает дополнительные нуклеотиды (дЦТФ) на 3'-конце молекулы кДНК во время реакции синтеза первой цепи. На следующем этапе, олигонуклеотид, содержащий комплементарную последовательность дГТФ и нуклеотидную последовательность уникального молекулярного идентификатора (UMI, на рисунке 3 обозначена как штрих-код) комплементарно гибридизуется с нематричным участком кДНК первой цепи. Обратная транскриптаза начинает использовать олигонуклеотид как новую матрицу (метод switch-oligo) и продолжает синтез первой цепи ДНК до конца олигонуклеотида. Далее цепи кДНК амплифицируют с помощью двух этапов вложенной ПЦР (nested PCR).

Первый этап проходит с использованием двух праймеров, один из которых комплементарен С-региону субъединицы ТКР, а второй праймер - фрагменту штрих-кода. Вторым этапом проходит так же, как и первый, но праймеры, используемые во втором этапе содержат в себе также адаптеры Illumina, участвующие в прикреплении цепи ДНК к подложке чипа для секвенирования. Кроме того, обратный праймер второго этапа также является вторым штрих-кодом, уникальным для каждого образца, что позволяет секвенировать несколько образцов на одном чипе параллельно. Секвенируют последовательности длиной около 150 пар нуклеотидов с 5' конца V-гена, а с другого конца секвенируют последовательность CDR3. Анализ данных секвенирования репертуаров ТКР проводили в программе VDJtools. Для выявления последовательностей субъединиц ТКР, чаще встречающихся в антиген-специфической фракции лимфоцитов, использовали статистический анализ методом точного теста Фишера.

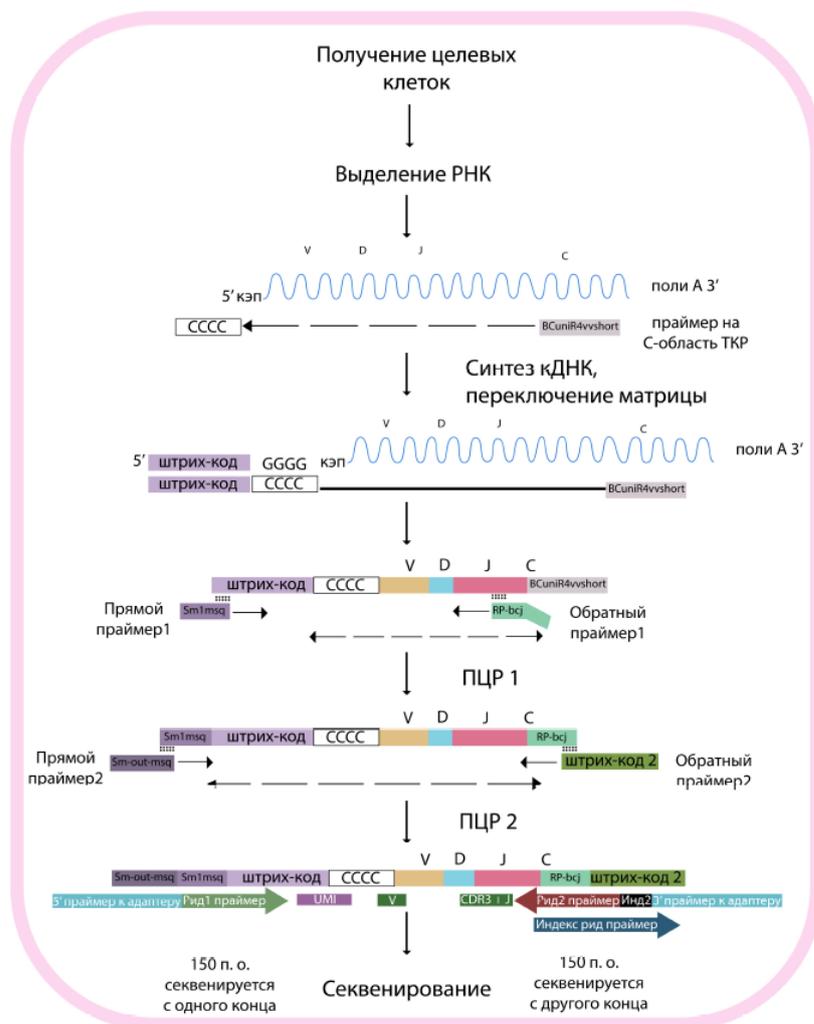


Рисунок 4. Схематическое изображение рабочего процесса подготовки библиотеки Т-клеточных рецепторов. За обратной транскрипцией следуют: быстрая амплификация 5'-концов ДНК (5'RACE), переключение матрицы (switch-oligo) и вложенная ПЦР (nested PCR). Иллюстрация предоставлена Васильевой А.

2.10 Клонирование генов субъединиц ТКР, потенциально специфичных к НА-1, в модульный лентивирусный конструктор

Нами был разработан модульный лентивирусный вектор для быстрого клонирования ТКР. Схема представлена на рисунке 5. Используемая нами система Golden Gate Assembly основана на особенностях работы рестриктаз II типа. Рестриктаза *VprI*, относящаяся ко II типу, распознает 7-нуклеотидную последовательность, а 4-нуклеотидный сайт рестрикции непосредственно примыкает к сайту распознавания, создавая 4-нуклеотидные липкие концы. Поскольку нуклеотидная последовательность сайта разрезания не находится в

сайте распознавания, то эти 4 нуклеотида в сайте разрезания можно подобрать таким образом, чтобы липкие концы из разных модулей комплементарно подходили друг другу, и несколько фрагментов ДНК могли быть лигированы в заданной последовательности в одной реакции. В нашем дизайне, нуклеотидные последовательности переменных (TRAV и TRBV) и константных (TRAC и TRBC1/2) регионов α и β субъединиц ТКР фланкированы сайтами рестрикции *VpiI*. В полностью собранном конструкте отсутствуют сайты распознавания *VpiI*, поэтому реакция сборки имеет однонаправленный характер.

Последовательности TRAV и TRBV были получены из ПЦР-библиотеки для секвенирования репертуаров ТКР, как описано в пункте 2.11. TRAC и TRBC имели нуклеотидную последовательность, взятую из генов мыши, и были синтезированы в компании Евроген, Россия. По литературным данным, использование мышиных TRAC и TRBC в трансгенных ТКР позволит избежать гетеродимеризации эндогенных и трансгенных субъединиц ТКР [168–170]. Кроме того, для образования дополнительной цистеиновой связи между субъединицами ТКР, в TRAC и TRBC были внесены аминокислотные замены T48C и S57C соответственно. Дополнительная цистеиновая связь усиливает стабильность комплекса ТКР на поверхности клетки [171].

Плазмиды, содержащие клонируемые модули, обладают канамициновой устойчивостью, собранный лентивирусный вектор обладает ампициллиновой устойчивостью. Таким образом, в одной реакции сборки участвуют: пустой лентивирусный вектор с промотором, вектор с TRAV, вектор с TRAC, вектор с TRBV, вектор с TRBC. Точный состав реакционной смеси и условия реакции приведены в пункте 2.12.

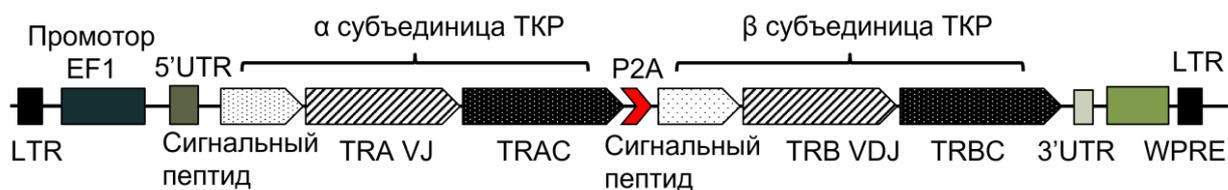


Рисунок 5. Схема модульного лентивирусного конструкта с HA-1-специфичными ТКР

2.11 Клонирование нуклеотидных последовательностей TRAV и TRBV для поиска ТКР, специфичных к HA-1

После биоинформатического анализа репертуаров ТКР были выявлены последовательности субъединиц ТКР, обогащенные в антиген-специфической фракции и потому представляющие интерес для клонирования в вектор.

ПЦР-библиотеки α и β субъединиц ТКР после второй стадии амплификации (см. пункт 2.9), полученные из антиген-специфичной фракции Т-клеток, использовали в качестве матрицы для ПЦР, прямой праймер имел некомплементарную часть с сайтом рестрикции *BpiI* и был специфичен к V-гену субъединицы ТКР, которую нужно клонировать. Обратный праймер также имел некомплементарную часть с сайтом *BpiI* и был специфичен к конкретному J-гену. ПЦР-продукт анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и очищали с помощью набора для очистки ДНК из геля (Евроген, Россия). Очищенный ПЦР продукт лигировали в плазмиду pJet1.2 (Thermo Fisher Scientific, США) и трансформировали в компетентные клетки *E.coli* (штамм DH5 α). Колонии после трансформации анализировали методом ПЦР, отобранные колонии культивировали в жидкой среде. Далее из бактериальных культур выделяли плазмидную ДНК. Плазмиды, содержащие нуклеотидные последовательности TRAV или TRBV, секвенировали по методу Сэнгера на приборе SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

2.12 Сборка вектора с трансгенным ТКР методом клонирования Golden Gate

В реакцию брали векторы, содержащие следующие компоненты: плазмиды с модулями TRAC, TRAV, TRBC, TRBV, и пустой лентивирусный вектор. Количество каждой плазмиды составляло 50 наномоль. В реакционную смесь добавляли 1 мкл рестриктазы *BpiI* (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мкл T4 лигазы (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мкл T4 лигазного буфера (Thermo

Fisher Scientific, США), доводили объем реакционной смеси дистиллированной водой до 20 мкл. Реакцию проводили в условиях, указанных в таблице 2.

Таблица 2. Реакция клонирования Golden Gate

Стадия	Время
1. Рестрикция, 37°C	5 мин
2. Лигирование, 22°C	10 мин
3. Вернуться на шаг 1	9 циклов
4. Рестрикция, 37°C	30 мин
5. Инактивация ферментов, 75°C	15 мин

Реакционную смесь трансформировали в компетентные клетки *E.coli* штамма NEB Stable (New England Biosciences, США). Трансформантов анализировали ПЦР-скринингом. Колонии, содержащие полностью собравшийся конструкт, наращивали и выделяли из них плазмидную ДНК. Далее производили рестрикционный анализ конструкта с помощью рестриктазы *Hind III* (Thermo Fisher Scientific, США). Затем отбирали плазмиды, соответствующие нужному паттерну рестрикции, и секвенировали методом Сэнгера последовательности CDR3 клонированного в данный вектор ТКР.

2.13 Получение лентивирусного супернатанта

Лентивирусные частицы, несущие трансгенный ТКР, специфичный к АСС-1У были получены в адгезивной клеточной линии НЕК293Т. Трансфекцию проводили следующим образом: за день до трансфекции, клетки НЕК293Т рассеивали в флакон Т75 в плотности $5 \cdot 10^6$ в 10 мл полной среды DMEM (Gibco, Великобритания) с 10% ФБС и антибиотиком, и инкубировали в CO₂ инкубаторе 20 ч. На следующий день, среду отбирали и добавляли 5 мл среды ОПТИ-МЕМ (Gibco, Великобритания). В ламинаре смешивали лентивирусные плазмиды из системы ViraPower (Invitrogen, США) с лентивирусным вектором в следующей пропорции: 5 мкг упаковочной плазмиды Plp1, 3мкг Plp2, 3 мкг

Pip-VSV-G, 5 мкг лентивирусного вектора. Плазмиды растворяли в 1,5 мл среды OPTI-MEM без сыворотки и перемешивали на вортексе. В другой пробирке в 1,5 мл среды OPTI-MEM без сыворотки растворяли 36 мкл липофектамина 2000 (Invitrogen, США) на вортексе. Затем раствор плазмид добавляли к раствору липофектамина и перемешивали аккуратным переворачиванием пробирки, после чего раствор инкубировали на комнатной температуре 15 мин. Далее раствор добавляли по каплям с помощью пипетатора в флакон с клетками HEK293T таким образом, чтобы смесь равномерно распределялась по монослою клеток. Клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 16 ч, затем аккуратно добавляли 10 мл среды DMEM и инкубировали ещё 48 ч. Затем супернатант отбирали, осаждали крупный дебрис центрифугированием при 3000g в течение 15 мин, после чего надосадочную жидкость фильтровали через фильтр с размером пор 0.45 мкм (Millipore, США). Вирусные частицы преципитировали из супернатанта с помощью Lenti-X Concentrator (Takara, Япония). Полученный преципитат растворяли в среде RPMI, аликвотировали и хранили при -80 °C.

Все прочие лентивирусные частицы получали в экспрессионной системе Expi 293 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Клетки культивировали в среде Expi (Thermo Fisher Scientific, США) в пластиковых колбах Эрленмейера в CO₂ инкубаторе с орбитальным шейкером в атмосфере с 8% CO₂. После 72 ч культивации клетки осаждали, а вирусные частицы преципитировали из супернатанта с помощью Lenti-X Concentrator в течение 24 ч. Преципитат осаждали центрифугированием при 3000 g и 4°C в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляли. Полученный преципитат растворяли в среде RPMI, аликвотировали и хранили при -80 °C.

2.14 Оценка вирусного титра методом проточной цитофлуориметрии

Для подсчета количества инфекционных частиц в концентрированном вирусном супернатанте клетки репортерной линии J76, не имеющие собственного ТКР и поверхностной экспрессии корецепторов CD4 и CD8,

рассевали на 24-ячеечный планшет в 1 мл полной среды RPMI в плотности $4 \cdot 10^5$ клеток на ячейку и добавляли вирусный концентрат в количестве 25 мкл, 10 мкл, 5 мкл, 1 мкл, и 0,25 мкл в разные ячейки. Клетки культивировали в CO₂ инкубаторе в течение 48 ч. После культивации клетки собирали и окрашивали анти-CD3 флуоресцентными антителами. Методом проточной цитофлуориметрии измеряли процент CD3-позитивных клеток по сравнению с клетками негативного контроля, трансдуцированными лентивирусом, кодирующим зеленый флуоресцентный белок. Наличие CD3 на поверхности клетки J76 означает, что её инфицировала функциональная лентивирусная частица и в клетке началась экспрессия трансгенного ТКР. Вирусный титр считали для каждого разведения по формуле:

$$x = n \cdot k / V,$$

где x - количество инф. частиц на единицу объема титруемого концентрата, k - процент CD3-позитивных клеток, n - число клеток на момент трансдукции. Вирусный титр считали для каждой ячейки и затем усредняли.

2.15 Получение клеточной линии K562 с трансгенным HLA-A*02

Из цельной крови здорового донора, гомозиготного по аллелю HLA-A*02, выделяли РНК с помощью набора Whole Blood RNA extraction kit (Thermo Fisher Scientific, США) и синтезировали кДНК ревертазой MINT и олиго (dT). С помощью специфичных праймеров, с матрицы кДНК амплифицировали последовательность гена HLA-A*02, и клонировали её в разработанный нами лентивирусный вектор методом клонирования Golden Gate. Лентивирусные частицы получали в клеточной линии Expi293 как описано в пункте 2.13. Полученными лентивирусными частицами трансдуцировали клетки K562 (ATCC CCL-243). Трансдукцию анализировали методом проточной цитофлуориметрии с помощью окраски антителами анти-HLA-A*02 (IgG2b, κ, клон BV7.2, PE, BD Biosciences, США). Эффективность трансдукции составила >95%, далее с этой линией работали без дополнительного обогащения.

2.16 Получение клеточной линии с J76 трансгенным CD2/28 и CD8

Из цельной крови здорового донора выделяли РНК с помощью специального набора и синтезировали кДНК ревертазой MINT и олиго (dT). С помощью опубликованных последовательностей праймеров [172], с матрицы кДНК амплифицировали последовательности генов CD2, CD28, CD8 α и CD8 β , и клонировали их в вектор pKan-T (Евроген, Россия). Далее последовательности CD2, CD28, а также α и β субъединиц CD8 были амплифицированы с использованием праймеров, несущих сайты рестрикции *BpiI* для сборки в модульный лентивирусный вектор, как описано в пункте 2.11. В реакцию брали очищенный из агарозного геля ПЦР-продукт в количестве 50 нмоль. Молекулы CD2 и CD28 в конструкторе представляли собой один модуль и экспрессировались как фьюжн-белок. Вторым и третьим модулем в конструкторе были α и β субъединицы CD8. Собранный лентивирусный конструктор трансформировали к клетки *E.coli*, выделяли плазмидную ДНК и секвенировали конструктор методом Сэнгера аналогично тому, как описано в пункте 2.12. Лентивирусные частицы получали в клетках Expi293 как описано ранее, и концентрировали. Трансдукцию клеток J76 анализировали по экспрессии CD8 методом проточной цитофлуориметрии используя анти-CD8 антитела, меченые PerCP-CyTM5.5 (BD Biosciences, США). Сначала проводили титрование лентивирусного концентрата на клетках J76, затем проводили трансдукцию с таким расчетом, чтобы по распределению Пуассона в подавляющем большинстве клеток было не более одной интеграции вируса, то есть при множественности заражения одна вирусная частица на пять клеток. Из трансдуцированной культуры, содержащей приблизительно 20% трансгенных клеток, получали клеточную линию сортировкой за маркер трансдукции CD8 в два этапа. На первом этапе производили иммуномагнитную сепарацию с помощью магнитных частиц, конъюгированных с анти-CD8 антителами. После первого этапа клетки культивировали два дня и приступали ко второму этапу сепарации на сортировщике FACS Aria III с использованием флуоресцентно меченых анти-

CD8 антител. Обогащенную культуру культивировали, криоконсервировали и использовали для создания панели линий с трансгенными ТКР, как описано в пункте 2.23.

2.17 Получение gRNA

С помощью программы Synthego (www.synthego.com) был произведен дизайн ряда последовательностей спейсеров (20-нуклеотидных последовательностей, комплементарных последовательности ДНК, в которой нужно внести разрыв) гайд-РНК, специфичных к TRAC и TRBC1/2. Синтезировали олигонуклеотид T7FwdVar (Евроген, Россия), содержащий T7 промотор, последовательность спейсера и часть скэффолда (инвариантная часть гайд-РНК, образующая шпильку). Обратный олигонуклеотид T7RevLong был универсальным и кодировал исключительно часть последовательности скэффолда гайд-РНК, и был частично комплементарен прямому олигонуклеотиду. Далее переменный и константный олигонуклеотиды добавляли в реакцию в количестве, указанном в таблице 3. Также в реакцию добавляли короткие амплифицирующие олигонуклеотиды. Амплификацию проводили, как указано в таблице 4. В реакции использовали высокопроизводительную и высокоточную полимеразу Q5 (New England Biosciences, США).

Таблица 3. Компоненты реакции для получения матрицы РНК-синтеза

Реагент	Объем, мкл
H ₂ O (обработанная DEPC)	13.4 μ l
Q5 буфер	4.0 μ L
Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов 10mM	0.8 μ l
T7FwdVar (1 μ M)	0.4 μ l
T7RevLong (1 μ M)	0.4 μ l
T7FwdAmp (100 μ M) (DF129)	0.4 μ l
T7RevAmp (100 μ M) (DR129)	0.4 μ l
Q5 ДНК-полимераза (2u/ μ l)	0.2 μ l

Таблица 4. Циклы амплификации матрицы для синтеза gRNA

Температура	Время	Шаг
95°	30 сек	1
95°	10 сек	2
57°	10 сек	4
72°	10 сек	4, вернуться на шаг 2, повторить 34 раза
72°	2 мин	5
4°	Бесконечно	6

Два микролитра ПЦР-продукта анализировали электрофорезом в 2% агарозном геле. Далее неочищенный ПЦР-продукт служил матрицей для синтеза РНК с помощью набора MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Компоненты реакции указаны в таблице 5.

Таблица 5. Компоненты реакции РНК-синтеза

Реагент	Объем, мкл
5x буфер	4 µl
АТФ (100 mM), 10 mM	2 µl
ГТФ (100 mM), 10 mM	2 µl
СТР (100 mM), 10 mM	2 µl
УТР (100 mM), 10 mM	2 µl
ПЦР-продукт	6 µl
T7 РНК-полимераза	2 µl

Реакционную смесь инкубировали 4 часа при 37°C. Далее количество РНК измеряли с помощью набора Qbit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). После синтеза РНК очищали с помощью колонки для очистки РНК (Qiagen, Германия), повторно измеряли концентрацию, аликвотировали по 90 пМ и хранили при -80°C.

2.18 Сборка рибонуклеопротеиновых комплексов Cas9/gRNA

Для сборки рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP) использовали 90 пМ (2950 нг) РНК и 30 пМ (5мкг) белка Cas9 (Thermo Fisher Scientific, США).

Объем реакции довели до 20 мкл буфером PBS, перемешивали и инкубировали 20 мин на комнатной температуре. Далее добавляли 1 мкл 10 мМ энхансера электропорации - олигонуклеотида, последовательность которого рассчитана биоинформатически и не содержит участков гомологии с ДНК человека [173]. Полученную смесь использовали для электропорации $1-5 \cdot 10^6$ Т-лимфоцитов, как описано в пунктах 2.19 и 2.21.

2.19 CRISPR/Cas9 нокаут ТКР в клетках линии Jurkat E6-1

Клетки линии Jurkat E6-1 (ATCC TIB-152) в количестве $2,5 \cdot 10^6$ клеток ресуспендировали в 90 мкл R буфера (Neon 100 mkl Transfection Kit, Thermo Fisher Scientific, США), добавляли 20 мкл RNP комплексов и аккуратно перемешивали пипетированием. Далее клетки подвергали электропорации на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific, США) при параметрах электропорации 1600 V, 10 мс, 3 разряда. После электропорации клетки незамедлительно переводили в 1 мл теплой среды RPMI с 10% ФБС. Клетки инкубировали в 24-ячеечной планшете в течение 72 ч. Далее анализировали нокаут ТКР методом проточной цитофлуориметрии. Клетки окрашивали анти-CD3 антителами (клон UCНТ1), Alexa Fluor 700 ® (Sony, Япония) и анти- α/β ТКР антителами, клон IP26, APC (Sony, Япония) и оценивали долю клеток, отрицательных по окрашиванию на ТКР и CD3.

2.20 Подготовка планшетов, покрытых ретронектином

Для увеличения эффективности трансдукции нами был использован ретронектин (Takara, Япония) – рекомбинантный белок, способствующий слиянию активированных лимфоцитов и лентивирусных частиц. Для покрытия ретронектином неадгезивных 24-ячеечных планшетов использовали раствор ретронектина в концентрации 25 мкг/мл. В ячейку добавляли 330 мкл раствора ретронектина и инкубировали 2 ч при комнатной температуре или ночь при +4°C. Затем раствор удаляли и добавляли 500 мкл 2% раствора БСА на ячейку и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Покрытые 2%

раствором БСА, планшеты могли храниться до 7 дней при +4°C. Непосредственно перед началом электропорации совмещенной с лентивирусной трансдукцией, раствор БСА удаляли, промывали ячейку раствором ФСБ 1 раз и добавляли концентрированный вирусный супернатант из расчета шесть вирусных частиц на одну инфицируемую клетку. Добавляли 1.5 мл полной среды RPMI с 500 U/мл IL-2, после чего переносили планшет в CO₂ инкубатор на 15 мин, далее переносили планшет в ламинар и приступали к электропорации.

2.21 CRISPR/Cas9 нокаут ТКР в первичной культуре Т-лимфоцитов, совмещенный с лентивирусной трансдукцией

Из фракции периферических мононуклеаров здорового донора выделяли CD8⁺ Т-лимфоциты методом иммуномагнитной сепарации с помощью анти-CD8 магнитных частиц (Miltenyi Biotec, Германия). Лимфоциты стимулировали с помощью магнитных частиц из набора активации и экспансии Т-клеток (Miltenyi Biotec, Германия) и культивировали в количестве 5*10⁶ клеток в 1 мл среды RPMI с 10% ФБС 50 U/мл IL-2 в течение 48 ч. После стимуляции, 1-5*10⁶ Т-лимфоцитов переносили из ячейки в 1,5 мл пробирку и помещали пробирку в сильное магнитное поле. Частицы концентрировались на стенке пробирки, а жидкость с клетками переносили в новую пробирку. Далее клетки промывали PBS 1 раз и ресуспендировали в 90 мкл буфера Т (Neon 100 mkl Transfection Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Добавляли 20 мкл раствора с RNP комплексами и аккуратно перемешивали пипетированием. В экспериментальные образцы добавляли по 45 пМ гайд-РНК, специфичной к TRAC и TRBC1/2, в мок-контроль добавляли буфер PBS. Далее клетки подвергали электропорации на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific, США) при параметрах электропорации 1600 V, 10 мс, 3 разряда. После электропорации клетки незамедлительно переводили в 1.5 мл теплой среды RPMI с 10% ФБС и 50 U/мл IL-2, 0.5 U/мл IL-7, 0.8 U/мл IL-15 и вирусными частицами, кодирующими вектор с трансгенным ТКР. После

завершения электропорации всех образцов, планшет переносили в CO₂ инкубатор на 10 мин. Далее планшет обматывали герметизирующей пленкой (Parafilm M, США) и центрифугировали при 1000 g и 32°C в течение 30 мин. После центрифугирования, планшет помещали в клеточный CO₂ инкубатор на 48 ч. Далее клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Эффективность нокаута эндогенного ТКР оценивали по экспрессии ТКР человека окраской анти- α/β ТКР антителами, клон IP26, APC (2133590, Sony, Япония). Эффективность трансдукции оценивали по экспрессии мышинового ТКР с помощью окраски флуоресцентно мечеными антителами, специфичными к β субъединице мышинового ТКР (APC, IgG2, λ 1, клон H57-597, BD Biosciences, США).

2.22 Обогащение и культивация трансгенных Т-лимфоцитов

После оценки эффективности трансдукции, описанной в предыдущем пункте, лимфоциты культивировали ещё 7 дней в полной среде RPMI с 50 U/мл IL-2, 0.5 U/мл IL-7, 0.8 U/мл IL-15. По мере необходимости клетки переносили в культуральный флакон T25, не допуская плотности большей, чем 10⁶ клеток на 1 мл среды. Далее клетки осаждали центрифугированием, промывали 1 раз буфером PBS и окрашивали в течение 15 мин антителами, специфичными к β субъединице мышинового ТКР, мечеными флуоресцентным красителем APC. Клетки промывали 1 раз буфером PBS и инкубировали 15 минут с магнитными частицами, конъюгированными с анти-APC антителами (Miltenyi Biotec, Германия). Далее с помощью магнитной колонки выделяли клетки, экспрессирующие мышиный ТКР. Обогащенную культуру культивировали в течение 4-5 недель в полной среде RPMI с 50 U/мл IL-2, 0.5 U/мл IL-7, 0.8 U/мл IL-15, каждую неделю производя полную замену среды.

2.23 Изучение функциональной активности трансгенных ТКР

Репортерные клетки линии J76, экспрессирующие трансгенные молекулы CD2/28/8 [172] и чьё получение описано в пункте 2.16, были использованы для

создания панели клеточных линий, несущих трансгенные ТКР. Клетки рассеивали в 24-ячеечные планшеты в количестве $3 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл полной среды RPMI в одной ячейке. Трансдукцию проводили добавлением концентрированного вирусного супернатанта из расчета одна вирусная частица на пять клеток. Клетки культивировали в CO_2 инкубаторе в течение 48 ч, после чего определяли эффективность трансдукции измерением процента позитивных по CD3 клеток методом проточной цитофлуориметрии. Далее, $2,5 \cdot 10^5$ лимфоцитов из трансдуцированной культуры переносили в 48-ячеечный планшет. Лимфоциты J76 стимулировали $5 \cdot 10^5$ клетками линии K562, экспрессирующими трансгенные молекулы HLA-A*02 и презентирующими экзогенный пептид HA-1 в концентрации 5000 нг/мл. Стимуляцию проводили в 48-ячеечных планшетах в 500 мкл полной среды IMDM (Gibco, Великобритания). В контрольных образцах стимуляторами выступали те же клетки-мишени, но без добавления пептида HA-1. Планшет помещали в CO_2 инкубатор на 16 ч. Далее ответ репортерных лимфоцитов анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Смесь клеток J76 и K562 окрашивали анти-CD8 антителами, мечеными APC, тем самым отделяя мишени от эффекторов при цитометрическом анализе. Далее измеряли процент репортерных лимфоцитов, экспрессирующих GFP. Если трансгенный ТКР распознавал презентруемый в молекулах HLA-A*02 пептид HA-1, то в репортерных лимфоцитах индуцировалась экспрессия GFP (рисунок 6). Клеточные культуры, ответившие экспрессией GFP на стимуляцию, считали имеющими функциональный HA-1-специфичный ТКР и культивировали в течение 7 дней, перенося в флакон T25. Далее производили сепарацию экспрессирующих CD3 клеток с помощью конъюгированных с анти-CD3 антителами магнитных частиц (Miltenyi Biotec, Германия). Выделенные клетки культивировали 2 дня, после чего проводили второй этап сепарации на сортировщике клеток BD FACS Aria III с помощью флуоресцентно меченых анти-CD3 антител. Полученные таким образом культуры репортерных лимфоцитов J76 экспрессировали молекулы CD2/28/8, а также трансгенный

ТКР, распознающий пептид НА-1. Культуры криоконсервировали и в дальнейшем использовали для изучения свойств трансгенных ТКР.

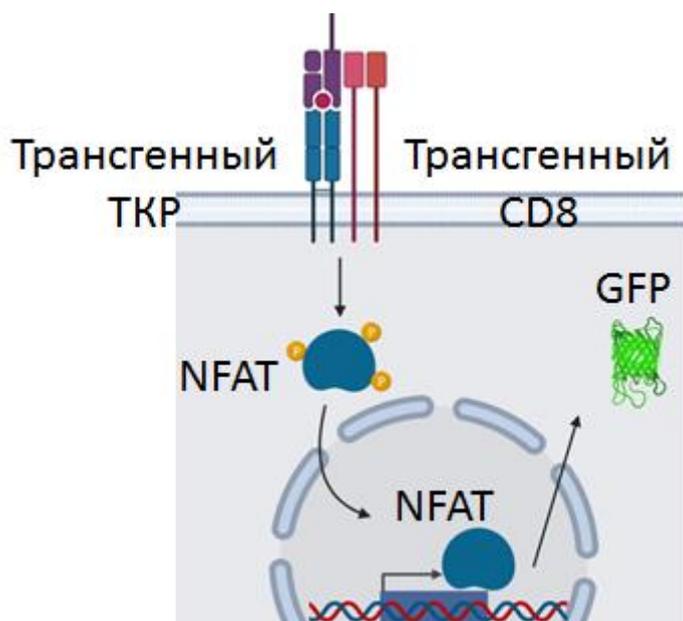


Рисунок 6. Схема активации репортерной линии J76. Трансгенный ТКР распознает антиген и запускает внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий к транспорту транскрипционного фактора NFAT в ядро, где он связывается со специфическим трансгенным промотором, запуская экспрессию GFP.

2.24 Изучение аффинности ТКР

В контексте этой работы, под аффинностью ТКР мы понимаем чувствительность ТКР к стимуляции комплексами HLA-пептид, то есть чем больше аффинность ТКР, тем меньшее количество пептида требуется для активации лимфоцита, и тем большее количество лимфоцитов может быть активировано одним и тем же количеством комплексов HLA-пептид. Аффинность НА-1-специфичных ТКР оценивали по проценту репортерных лимфоцитов J76, экспрессирующих GFP после стимуляции одиннадцатью последовательными разведениями пептида НА-1, презентруемого в молекулах HLA-A*02 клетками линии K562. Стимуляцию проводили в двух независимых экспериментах, каждая экспериментальная точка имела две технические повторности.

Для того, чтобы отделять мишени от эффекторов при цитометрическом анализе, эффекторы окрашивали липофильным красителем DID (Invitrogen, США). Перед проведением стимуляции, $1.5 \cdot 10^7$ клеток J76 отбирали в 15-мл

пробирку, осаждали и ресуспендировали в 1 мл среды RPMI без сыворотки, добавляли 0.5 мкл липофильного красителя DID, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 15 мин. Далее клетки осаждали центрифугированием и промывали два раза средой RPMI без сыворотки.

Титрование раствора пептида HA-1 осуществляли следующим образом. Сначала, к 1 мл среды полной среды IMDM добавляли 10 мкл раствора пептида в ДМСО в концентрации $5 \cdot 10^4$ нг/мкл. Таким образом, концентрация пептида в среде была $5 \cdot 10^5$ нг/мл (4,88 нмоль/мл). Далее раствор титровали путем десяти последовательных пятикратных разведений. В одну ячейку 96-ячеечного круглодонного планшета переносили по 100 мкл среды из каждого разведения.

Далее, в каждую ячейку с раствором пептида добавляли по 50 мкл среды, содержащей $1,25 \cdot 10^5$ меченных DID репортерных клеток J76, и 50 мкл среды с $2,5 \cdot 10^5$ клеток-мишеней K562. Содержимое ячейки перемешивали пипетированием. Стимуляцию разведениями пептида проводили в двух повторностях. Делали также мок-контроль (только клетки J76 и K562 без пептида) и нестимулированный контроль (только лимфоциты без добавления K562). Клетки инкубировали 16ч в CO₂ инкубаторе. Далее клетки осаждали центрифугированием в планшете при 300g в течение 5 мин, промывали 1 раз раствором ФСБ, добавляли 200 мкл ФСБ в ячейку и анализировали на проточном цитофлуоримetre MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) с использованием планшетного ридера. Анализ полученных данных проводили в программе FlowJo (BD Biosciences, США). В DID-позитивной фракции (клетки-эффекторы J76) считали процент GFP-позитивных клеток для каждого разведения. На основании этих данных в программе GraphPad Prism 9 (GraphPad LLC, США) для каждого эксперимента вычисляли EC₅₀ (количество пептида, необходимое для достижения 50% максимального эффекта стимуляции) для каждого ТКР. Диапазон значений, полученных в двух независимых экспериментах, служил мерой оценки аффинности ТКР.

2.25 Стимуляция репортерных линий J76 периферическими мононуклеарами, презентующими эндогенный пептид HA-1

Для большинства доноров и пациентов имелись данные глубокого HLA-типирования, полученные из базы доноров костного мозга. Также образцы периферические мононуклеары доноров и пациентов после разморозки повторно типировали на экспрессию HLA-A*02 методом проточной цитофлуориметрии окраской анти- HLA-A*02 антителами, конъюгированным с PE (клон BB7.2, Sony, Япония). Наличие минорного антигена HA-1 определяли методом ПЦР в реальном времени опубликованным методом [94].

Для подготовки к эксперименту, $1,5 \cdot 10^7$ клеток J76 окрашивали красителем DID как описано ранее. Параллельно производили разморозку криоконсервированных образцов периферической крови: криопробирки размораживали на водяной бане и переносили содержимое в 15 мл пробирку, куда по каплям добавляли 10 мл теплой среды RPMI с 10% ФБС и антибиотиком, постоянно помешивая. Далее клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 300 g, убрали надосадочную жидкость и растворяли осадок в 1 мл полной среды RPMI. Следующим шагом, клетки фильтровали через нейлоновый фильтр с размером отверстий 20 мкм (Miltenyi Biotec, Германия). На этапе фильтрования удаляли большую часть дедбриса и мертвых клеток. После фильтрования производили подсчет жизнеспособности размороженных клеток, для дальнейших опытов брали только культуры с жизнеспособностью более 90%.

Стимуляцию репортерных клеток J76 с трансгенным ТКР проводили следующим образом: в ячейку 48-ячеечного планшета переносили $1,25 \cdot 10^5$ репортерных лимфоцитов и $2,5 \cdot 10^5$ периферических мононуклеаров исследуемого образца, доводили объем полной среды RPMI до 500 мкл и инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 16 ч. Далее клетки переносили в 96-ячеечный планшет с помощью многоканальной пипетки, осаждали центрифугированием в планшете, промывали PBS и анализировали на

проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) с помощью планшетного ридера. Анализ полученных данных проводили в программе FlowJo. Степень активации репортерных лимфоцитов оценивали по проценту GFP-позитивных клеток в DID-позитивной фракции.

2.26 Изучение функциональной активности трансгенных CD8⁺ Т-клеток методом ИФА

Функциональную активность CD8⁺ Т-клеток с трансгенными ТКР оценивали по количеству продуцируемого в среду IFN- γ методом ИФА. Пептид HA-1 титровали по схеме, описанной в пункте 2.24: начиная с концентрации 4,88 нмоль/мл делали одиннадцать последовательных пятикратных разведений в полной среде RPMI. В ячейку 96-ячеечного планшета добавляли по 100 мкл среды из каждого разведения, 50 мкл среды с $1,25 \cdot 10^5$ CD8⁺ Т-клеток, и 50 мкл среды с $2,5 \cdot 10^5$ клеток-мишеней K562. Содержимое ячейки перемешивали пипетированием. Стимуляцию проводили в трех повторностях. Клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 16 ч. После стимуляции, для ИФА отбирали 20 мкл среды из каждой ячейки и проводили анализ в соответствии с протоколом производителя набора для ИФА (Хема, Россия).

2.27 Изучение цитотоксичности CD8⁺ Т-клеток, модифицированных трансгенным ТКР

Культура CD8⁺ Т-клеток с трансгенным ТКР и CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР была получена и обогащена как описано в пунктах 2.21 и 2.22. Функциональную активность CD8⁺ Т-клеток, модифицированных трансгенными ТКР, оценивали измерением процента клеток-мишеней в стадии апоптоза или некроза методом проточной цитофлуориметрии, а также по количеству секретированного после стимуляции IFN- γ методом ELISA.

В опытах по оценке цитотоксичности, клетками-мишенями выступали криоконсервированные образцы периферической крови пациентов со

злокачественными новообразованиями крови. Клетки размораживали, фильтровали от дебриса и подсчитывали процент жизнеспособных клеток, как описано в пункте 2.25. $3 \cdot 10^7$ CD8⁺ Т-лимфоцитов окрашивали красителем DID аналогично описанному ранее. Далее, $2,5 \cdot 10^5$ периферических мононуклеаров высевали в 48-ячеечный планшет и добавляли $1,25 \cdot 10^6$ меченых красителем DID CD8⁺ Т-клеток. Каждая экспериментальная точка имела три технические повторности. Для образцов от каждого пациента делали положительный и отрицательный контроль. В ячейки положительного контроля добавляли 4,88 нмоль/мл пептида HA-1 (LifeTein, США), а в ячейках отрицательного контроля эффекторами выступали CD8⁺ Т-лимфоциты из мок-трансдукции, то есть к которым при трансдукции вместо вируса добавляли ФСБ. После совместного культивирования в течение 16 ч при 37 °С и 5% CO₂, клетки переносили в круглодонный 96-ячеечный планшет, осаждали центрифугированием при 300g в течение 5 минут и окрашивали с использованием CellEvent Caspase-3/7 (eBioscience, США) согласно протоколу производителя. Набор содержит флуоресцентный субстрат для каспаз 3 и 7, что позволяет детектировать проходящие апоптоз клетки. Также в набор входит ДНК-интеркалирующий краситель 7AAD, что позволяет детектировать клетки в состоянии некроза и позднего апоптоза. Анализ производили на проточном цитофлуориметре MACS Quant с использованием планшетного ридера. Анализ цитометрических данных проводили в программе FlowJo. Из анализа исключали клетки-эффекторы, положительные по окраске на DID. Цитотоксический эффект измеряли по проценту клеток-мишеней, позитивных по окраске на каспазы 3/7 и 7AAD.

2.28 Фрагментный анализ ДНК клеток после редактирования CRISPR/Cas

Чтобы исследовать изменения в геноме, вызванные редактированием CRISPR/Cas, выделяли ДНК из культуры, подвергшейся электропорации RNP комплексами с помощью набора для выделения ДНК (Thermo Scientific, США)

и исследовали нокаутируемые гены TRAC, TRBC1 и TRBC2 методом фрагментного анализа. Обратный праймер содержал флуоресцентный зонд, что делало возможным определение размера ПЦР-продукта с точностью до нуклеотида при капиллярном электрофорезе на приборе SeqStudio Genetic Analyzer. Таким образом можно различить по размеру ПЦР-продукт, полученный из гена дикого типа, и мутантного аллеля, содержащий индел, возникший после репарации двунитевого разрыва, вызванного CRISPR/Cas редактированием, тем самым детектируя нокаут на молекулярном уровне.

2.29 Оценка количества вирусных интеграций на геном методом ПЦР в реальном времени

Количество интеграций вирусного вектора на геном измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Геномную ДНК из трансдуцированных клеток выделяли с помощью набора для выделения ДНК GeneJET (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя. В реакции использовали 30–60 нг геномной ДНК. Количество трансгена оценивали с помощью праймеров и флуоресцентного зонда, специфичных к гену *rev*, содержащемуся в лентивирусном векторе. Число геномов клеток оценивали с помощью праймеров и зонда, специфичных к гену $\beta 2$ -микроглобулина. Абсолютное количество молекул матрицы в реакции оценивали по величине C_q . Среднее число интеграций вектора в геном оценивали по соотношению копийности геномной и провирусной ДНК.

2.30 Лентивирусная трансдукция CD8⁺ Т-лимфоцитов с использованием полибрена

Для получения трансгенных CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к АСС-1У, использовали лентивирусную трансдукцию методом спинфекции с добавлением энхансера трансдукции, катионного полимера полибрена.

Из фракции периферических мононуклеаров здорового донора выделяли CD8⁺ Т-лимфоциты методом иммуномагнитной сепарации с помощью анти-

CD8 магнитных частиц (Miltenyi Biotec, Германия). Лимфоциты стимулировали с помощью магнитных частиц из набора активации и экспансии Т-клеток (Miltenyi Biotec, Германия) и культивировали в количестве $5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл полной среды RPMI с 10 U/мл IL-2 в течение 48 ч. Далее 10^6 лимфоцитов переносили в ячейку 24-ячеечного планшета, добавляли концентрированный лентивирусный супернанант из расчета 6 инфекционных частиц на одну клетку, добавляли полную среду RPMI, 10 U IL-2 и 1 мкл раствора полибрена в концентрации 10 мг/мл (Merck, Германия). Планшет переносили в CO₂ инкубатор на 15 минут, после чего планшет обматывали герметизирующей пленкой и центрифугировали при 900 g и 32°C в течение 90 мин. После спинфекции пленку удаляли и переносили планшет в CO₂ инкубатор на 16 ч. Затем в культурах производили замену среды на полную среду RPMI с 10 U/мл IL-2, и культивировали ещё сутки, после чего клетки использовали в функциональном тесте по измерению секреции IFN- γ .

2.31 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ данных, построение кривых титрования и визуализацию данных цитотоксичности проводили в программе GraphPad Prizm 9.

На рис.17 представлена доля активировавшихся репортерных клеток, усредненной между двумя техническими повторностями, в каждой точке титрования. Планки погрешности обозначают абсолютную ошибку среднего. Оценку значения аффинности ТКР проводили с помощью вычисления полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀). Среднее значение EC₅₀ между двумя независимыми экспериментами представлено на рис.18 горизонтальной чертой, прямоугольниками обозначены 95% доверительные интервалы.

На рис. 19 показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) клеток между тремя независимыми окрашиваниями декстрамером; планки погрешностей означают абсолютную ошибку среднего.

На рис.20 представлена доля эффекторов-репортерных клеток J76, активировавшихся при стимуляции клетками-мишенями: периферическими мононуклеарами здоровых доноров трех фенотипов: положительных по МАГ НА-1, отрицательных по МАГ НА-1, и отрицательных по HLA-A*02. Каждая точка соответствует усредненным результатам одного независимого эксперимента в двух технических повторностях с клетками одного донора, суммарно протестированы клетки 9 здоровых доноров. Планка погрешности обозначает абсолютную ошибку среднего.

На рис.21, каждая точка означает средний процент GFP⁺ репортерных клеток между тремя техническими повторностями стимуляции клетками одного донора с указанным генотипом, планки погрешностей обозначают абсолютную погрешность среднего, однако из-за очень малой дисперсии между техническими повторностями, не видны на графике.

На рис.22 каждая точка соответствует значению средней интенсивности флуоресценции окраски HLA-A*02 для клеток одного здорового донора или пациента. Высота столбца соответствует медианному значению, планки погрешностей обозначают абсолютную ошибку среднего. Статистическая значимость: U-критерий Манна-Уитни.

На рис.23 представлен средний процент нокаутных клеток между тремя независимыми экспериментами по CRISPR/Cas нокауту эндогенного ТКР, планки погрешностей обозначают абсолютную ошибку среднего.

На рис. 25 точками обозначено среднее между тремя техническими повторностями количество IFN- γ , планки погрешности обозначают абсолютную ошибку среднего.

На рис.26 каждая точка соответствует средней интенсивности флуоресценции лимфоцитов от одного из пяти разных доноров. Высота столбцов соответствует медианному значению, планки погрешностей представляют абсолютную ошибку среднего. Статистическая значимость: t-критерий Стьюдента.

На рис.29Б, каждая точка обозначает долю клеток-мишеней в экспериментальном образце, положительных по каспазам 3/7 и/или 7AAD. Приведенные на графике значения являются арифметическим средним между результатами двух независимых экспериментов по стимуляции трансгенных CD8⁺ Т-клеток от двух разных доноров, каждый из двух независимых экспериментов выполнен в двух технических повторностях. Статистическая значимость: U-критерий Манна-Уитни. Горизонтальная черта обозначает среднее значение в каждой группе.

Достоверность увеличения цитотоксического ответа при добавлении экзогенного пептида показана с помощью дисперсионного анализа (рис.29В).

Для поиска взаимосвязи между цитотоксическим ответом и процентом бластных клеток в образце, был применен корреляционный анализ по методу Спирмена (рис. 30).

Биоинформатический анализ репертуара ТКР, включающий в себя анализ сцепленности V и J генов (рис.14), распределение длин CDR3 (рис.16), анализ частоты обогащения (рис.12), кластерный анализ гомологии (рис. 13) и оценка индекса Шеннона (рис.15) выполнены Александрой Хмелевской с помощью статистической утилиты BioPython.

Для выявления последовательностей субъединиц ТКР, чаще встречающихся в антиген-специфичной фракции, был использован точный тест Фишера (рис.12А). Частота встречаемости каждой последовательности, выраженная в отношении количества прочтений этой последовательности к суммарному количеству прочтений всех последовательностей ТКР в двух фракциях (антиген-специфичной и антиген-неспецифичной) среди всех культур. Каждая уникальная последовательность субъединицы ТКР обозначена точкой на диаграмме, цветом обозначены последовательности, статистически достоверно обогащенные в антиген-специфичной фракции. Доля последовательности ТКР в соответствующей ей культуре (ячейке) обозначена с помощью столбчатой диаграммы (рис.12Б).

Анализ степени гомологии CDR3 (рис.13) последовательностей ТКР и визуализация выполнены в программе ALICE. Для определения степени гомологии была использована метрика расстояния Левенштейна. Каждая индивидуальная последовательность CDR3 представлена кругом на диаграмме. Соединяющая линия между кругами означает расстояние между последовательностями CDR3 не более 1-3 аминокислотных замен. Разными цветами обозначено происхождение из разных доноров.

Для сравнения индекса разнообразия Шеннона, из базы данных VDJdb (<https://vdjdb.cdr3.net>) были загружены случайные выборки последовательностей CDR3, специфичных к определенным эпитопам (KLG (цитомегаловирус), GIL (вирус гриппа А), NLV (цитомегаловирус), ELA (белок MLANA, Homo Sapiens), AVF (вирус Эпштейна-Барр), размер каждой выборки был сопоставим с размером оцениваемой выборки HA-1-специфичных ТКР (~60 последовательностей). Затем последовательности CDR3, соответствующие каждому эпитопу, были случайным образом разделены на 9 выборок, для каждой выборки было рассчитано значение индекса Шеннона, полученное для каждого эпитопа распределение индексов Шеннона было проверено на нормальность. Для оценки статистической значимости различий значений индексов Шеннона для α и β субъединиц HA-1-специфичных ТКР использовали t-тест Стьюдента. На рис.15, горизонтальная черта обозначает медиану, границы диаграммы определены нижними и верхними квартилями. Верхняя и нижняя горизонтальные черты обозначают максимальное и минимальное значение в выборке.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Получение культур CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к АСС-1У

Из двух доноров, имеющих аллель HLA-A*24 и генотип АСС-1^{c/c} (гомозиготы по неиммуногенному аллелю) были выделены наивные CD8⁺ Т-клетки и проведена их стимуляция аутологичными дендритными клетками, нагруженными экзогенным пептидом АСС-1У. В контрольных культурах

либо проводили стимуляцию пептидом АСС-1С, либо не добавляли никакой пептид. Клетки рассеивали таким образом, чтобы в каждой ячейке было $5 \cdot 10^5$ Т-клеток: при таком начальном количестве Т-клеток в ячейке ожидается не более одного антиген-специфичного клона [174]. После десятидневной культивации культуры окрашивали тетрамерными комплексами HLA-A*024-АСС-1У для выявления АСС-1У-специфичных клонов.

Наличие тетрамер-позитивных клеток было детектировано только в четырех из двадцати трех культур, полученных из одного донора, и в трех из восемнадцати культур у другого донора (таблица 2 приложения). Это свидетельствует об относительно невысокой частоте сборки рецепторов, специфичных к антигену АСС-1У. На рисунке 7А показано репрезентативное окрашивание тетрамером одной культуры, которая была взята для дальнейшего изучения и из которой был отобран ТКР для клонирования. В контрольных культурах, где производилась стимуляция дендритными клетками без экзогенного пептида АСС-1У (рис. 7Б) или с альтернативным аллельным вариантом, пептидом АСС-1С (рис. 7В), не были детектированы АСС-1У-специфичные клоны. Также в контрольных экспансиях не было обнаружено специфичных к пептиду АСС-1С клонов (данные не приведены). Поскольку все доноры имели генотип АСС-1^{С/С}, результаты этого эксперимента подтверждают общепринятое представление о механизме формирования кодоминантных МАГ: в Т-клеточном репертуаре доноров, гомозиготных по варианту АСС-1С, клоны, распознающие АСС-1С с высокой аффинностью, удаляются при негативной селекции.

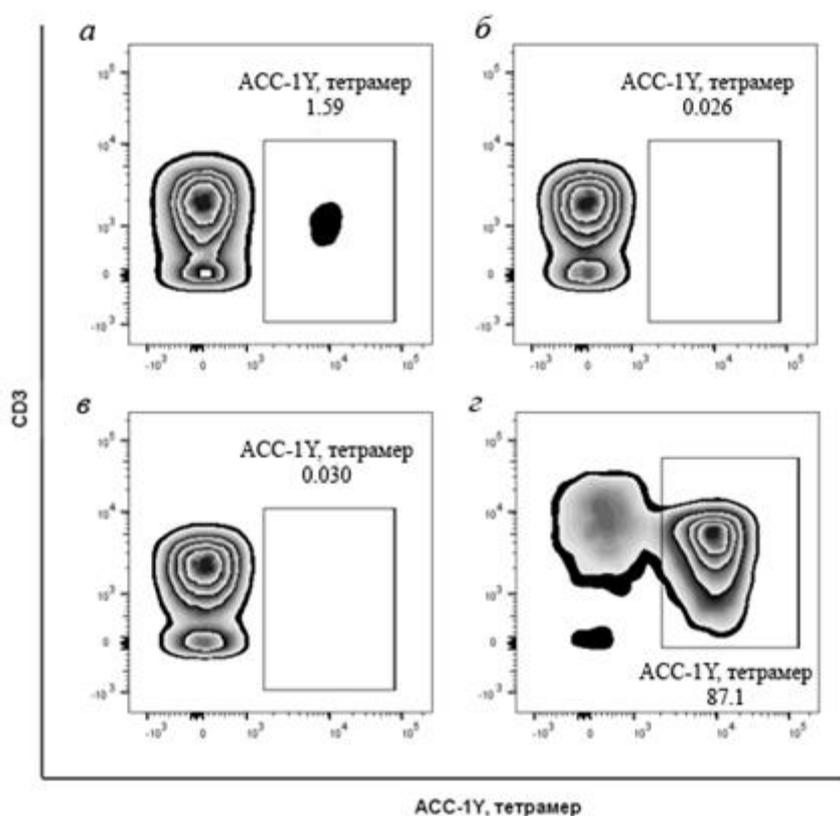


Рисунок 7. АСС-1У-специфичная экспансия CD8⁺ Т-лимфоцитов. Окраска тетрамером АСС-1У Т-лимфоцитов, культивируемых с пептидом АСС-1У (а), без пептида (б), с пептидом АСС-1С (в). Окраска тетрамером АСС-1У культуры клеток, обогащенной магнитной сепарацией (г). Из работы [128]

Для дальнейшего изучения нами была выбрана одна культура с наибольшим процентом клеток, окрасившихся тетрамером HLA-A*024-АСС-1У. Связавшиеся с тетрамером клетки выделяли методом иммуномагнитной сепарации. Анализ показал высокую степень очистки культуры: если в исходной культуре АСС-1У-специфичных клеток было лишь 1,59%, то после обогащения, число антиген-специфичных клеток составило 87,1% (рис. 7Г). Далее была проведена стимуляция лимфоцитов из обогащенной культуры аутологичными клетками В-ЛКЛ, презентующими экзогенные пептиды АСС-1У или АСС-1С. Лимфоциты секретировали IFN- γ только при стимуляции пептидом АСС-1У, но не его альтернативным вариантом АСС-1С. Клетки в контрольной экспансии, полученной при стимуляции пептидом АСС-1С, не реагировали при повторной стимуляции обоими вариантами пептида (рис. 8а).

Обогащенная культура АСС-1У-специфичных Т-клеток обладала выраженной цитотоксичностью только в отношении аутологичных клеток В-ЛКЛ, презентирующих экзогенный пептид АСС-1У, но не пептид АСС-1С. Стимуляция клетками без экзогенного пептида также не приводила к секреции IFN- γ (рис. 8б). Клетки из контрольной экспансии не демонстрировали выраженной цитотоксичности ни в одном из экспериментов.

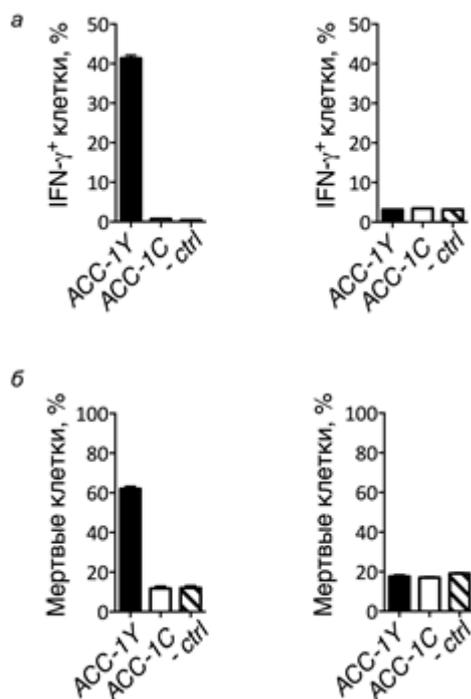


Рисунок 8. Т-клетки после АСС-1У-специфичной экспансии распознают и уничтожают только клетки, которые презентируют на своей поверхности пептид АСС-1У, но не АСС-1С. а – Внутриклеточная продукция IFN- γ . б – Цитотоксичность лимфоцитов экспансии в отношении клеток-мишеней. Представлены данные для антигенспецифичной культуры АСС-1У (слева) и культуры, изначально стимулированной пептидом АСС-1С (справа). В качестве клеток-мишеней использовали клетки аутологичной лимфобластической линии, нагруженные синтетическим пептидом АСС-1У. В качестве контроля использовали лимфобластические клетки без пептида (-Ctrl) и нагруженные пептидом АСС-1С. На диаграмме изображено среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 3$. Из работы [128]

3.2 CD8⁺ Т-клетки, модифицированные специфичным к АСС-1У трансгенным ТКР, секретируют IFN- γ при антигенной стимуляции

Из клеток обогащенной культуры, исследованной в предыдущем пункте, выделяли ДНК и клонировали нуклеотидные последовательности α - и β -субъединиц ТКР в вектор. Были получены десять плазмид с полными

нуклеотидными последовательностями α - и β -субъединиц и проведено их секвенирование по Сэнгеру. Все последовательности были идентичны и принадлежали одному ТКР. Это подтверждает нашу гипотезу о том, что при использованной нами начальной плотности культивации лимфоцитов в $5 \cdot 10^5$ клеток на ячейку, в каждой ячейке присутствует только один антиген-специфичный клон. Анализ в сервисе ImMunoGeneTics определил аллели специфичного к АСС1-У ТКР: *TRAV131*02* и *TRAJ3*01* в гене α -субъединицы, *TRBV6-5*01*, *TRBD2*02* и *TRBJ1-3*01* в гене β -субъединицы. После идентификации, последовательности α - и β -субъединиц ТКР были клонированы в лентивирусный вектор, pLenti-V5 (Invitrogen, США), подходящий для модификации первичных Т-клеток человека. Схема конструктора представлена на рисунке 9.

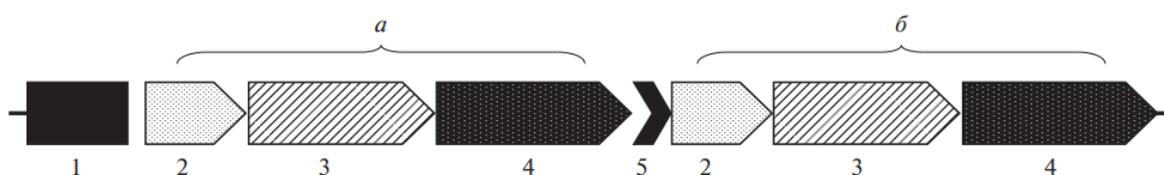


Рисунок 9. Схема лентивирусного конструктора. Экспрессия трансгенного ТКР контролируется цитомегаловирусным промотором (1). ТКР состоит из полных α - (а) и β -субъединиц (б), разделенных пептидом 2А (5). Каждая субъединица состоит из лидерного пептида (2), TRAV/TRBV (3) и TRAC/TRBC (4). Из работы [128]

Лентивирусные частицы, содержащие этот вектор, были получены в клеточной линии НЕК293Т, далее супернатант концентрировали в 10 раз. Супернатант титровали на клетках НЕК293Т и анализировали методом qPCR количество интеграций вируса на геном. Титр концентрированного супернатанта составил около $2 \cdot 10^6$ инфекционных вирусных частиц на 1 мл.

Полученными лентивирусными частицами трансдуцировали $CD8^+$ Т-лимфоциты, полученные из здорового донора с генотипом HLA-A*24⁺ и АСС1^{C/C}. При трансдукции брали вирус в соотношении две вирусные частицы на одну клетку. Спустя 48 ч, трансдуцированные клетки стимулировали аутологичными облученными В-ЛКЛ, презентующими экзогенный пептид АСС-1У, или клетками без пептида в качестве контроля, стимуляцию

проводили 16 ч. Специфический ответ трансдуцированной культуры CD8⁺ Т-клеток на пептид АСС-1У был подтвержден методом внеклеточного окрашивания на IFN- γ (рис. 10В). Ответ на клетки, не презентующие экзогенного пептида АСС-1У, не был детектирован (рис.10Б). 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- γ .

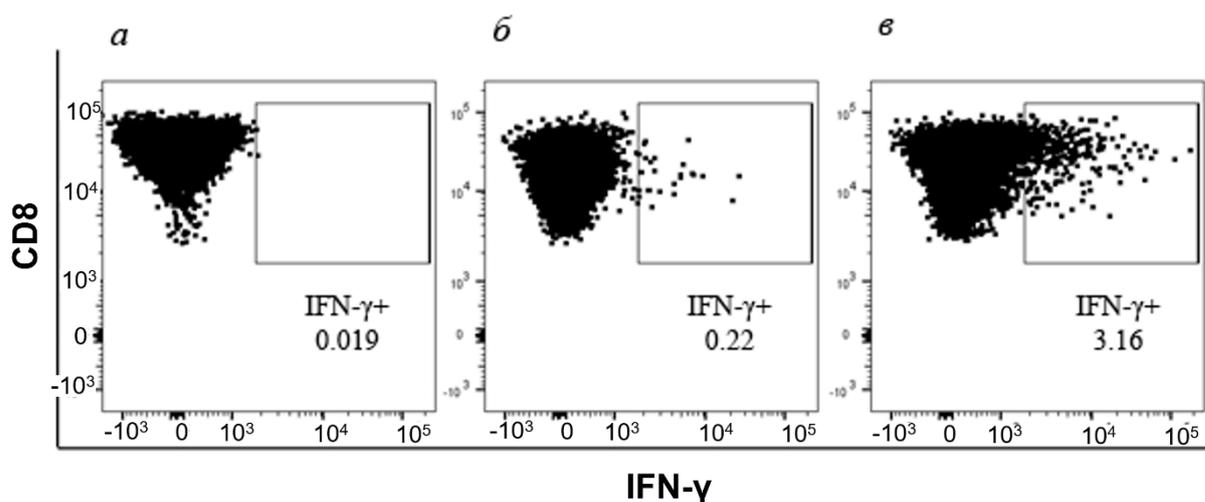


Рисунок 10. Трансдуцированные Т-клетки секретируют IFN- γ в ответ на антигенную стимуляцию. Внеклеточная окраска на IFN- γ . (А) – Неокрашенный контроль. (Б) – Клетки трансдуцированной культуры, инкубированные с В-ЛКЛ без пептида, или (В) с экзогенным пептидом АСС1-У. Опубликовано в [128]

Поиск оптимального ТКР для вероятного клинического применения требует сравнения характеристик относительно большого количества ТКР. Для этого нам потребовалось, во-первых, использовать более эффективный метод детекции антиген-специфичных ТКР, а во-вторых, создать платформу, позволяющую быстрое клонирование большого количества конструктов.

В дальнейших опытах мы сфокусировались на изучении ТКР, специфичных к НА-1, поскольку аллель HLA A*02:01 более распространен в российской популяции, чем аллель HLA A*24:02.

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

Наивные CD8⁺ Т-лимфоциты 5 здоровых доноров, имеющих HLA-A*02 и отрицательных по НА-1 стимулировали аутологичными дендритными клетками, презентующими экзогенный пептид НА-1, как указано на рисунке 11. При стимуляции клетки рассеивали в количестве $2 \cdot 10^5$ наивных CD8⁺ 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⁺ 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 [177,178].

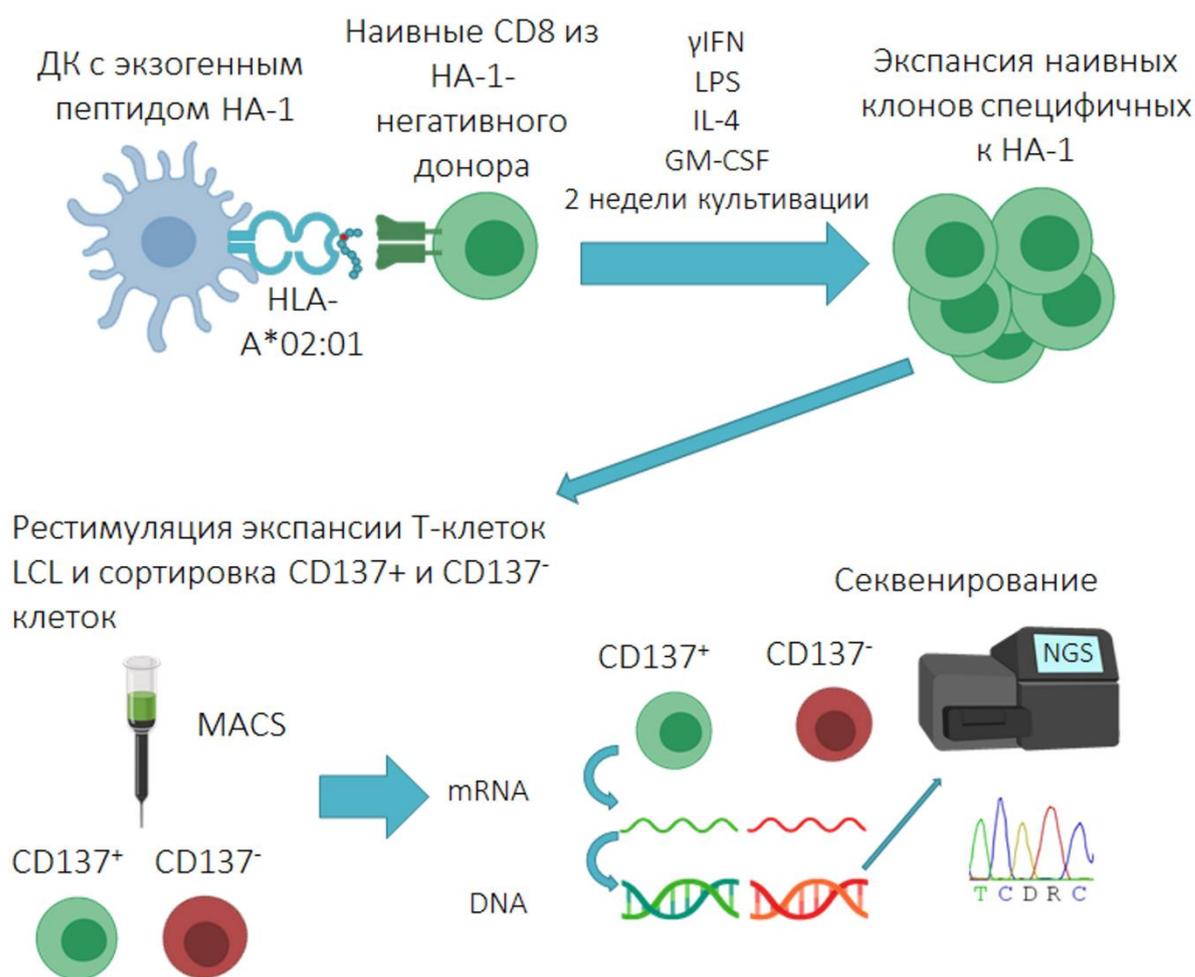


Рисунок 11. Схема получения репертуара ТКР специфичных к HA-1 с использованием CD137 как маркера антиген-специфичной фракции. Дендритные клетки, презентующие экзогенный пептид HA-1, культивируют в течение 14 дней с аутологичными наивными CD8⁺ Т-лимфоцитами в присутствии цитокинов. После культивации культуры рестимулировали клетками В-ЛКЛ, презентующими экзогенный пептид. Из активировавшейся (CD137⁺) и неактивировавшейся (CD137⁻) фракции клеток выделяли мРНК, синтезировали кДНК и анализировали ТКР методом высокопроизводительного секвенирования.

Чтобы выявить специфичные к HA-1 клоны, после стимуляции и экспансии культуру CD8⁺ Т-клеток из каждой ячейки окрашивали тетрамером HLA-A*02:01-HA-1. Сортировку антиген-специфичной фракции клеток проводили двумя различными методами – рестимуляцией или сортировкой с помощью тетрамера. В первом методе Т-лимфоциты культивировали с клетками В-ЛКЛ, презентующими экзогенный пептид HA-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 p845 и p180.

Для доноров p1102 и p005 проводили магнитную сепарацию тетрамер-позитивной фракции. Метод получения антиген-специфичной фракции клеток указан в таблице 1 приложения.

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 α или β субъединиц ТКР в образце из этой культуры (рис. 12). На рис.12а приведен репрезентативный пример для культур из донора p845. 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.12Б, 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.

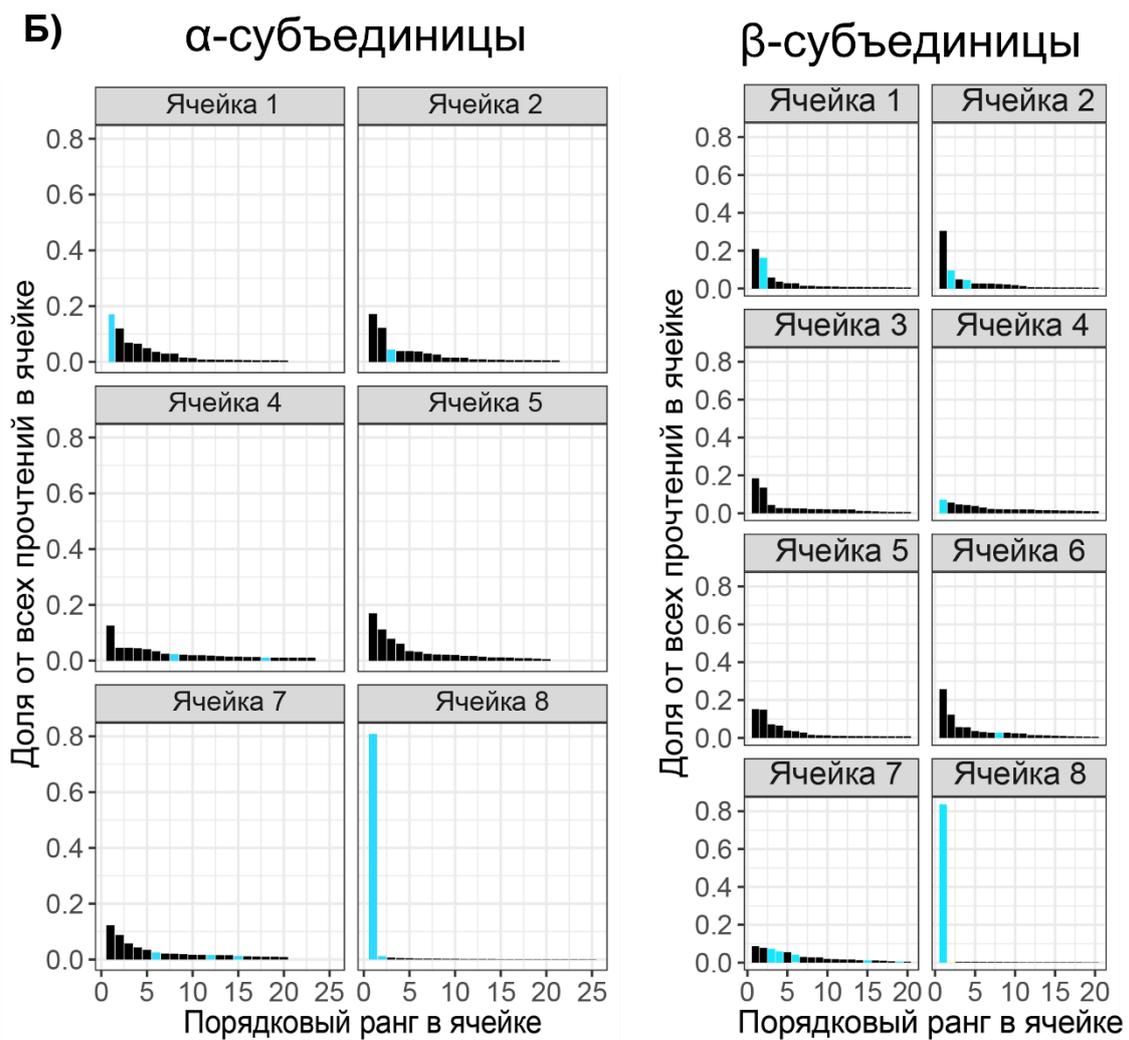
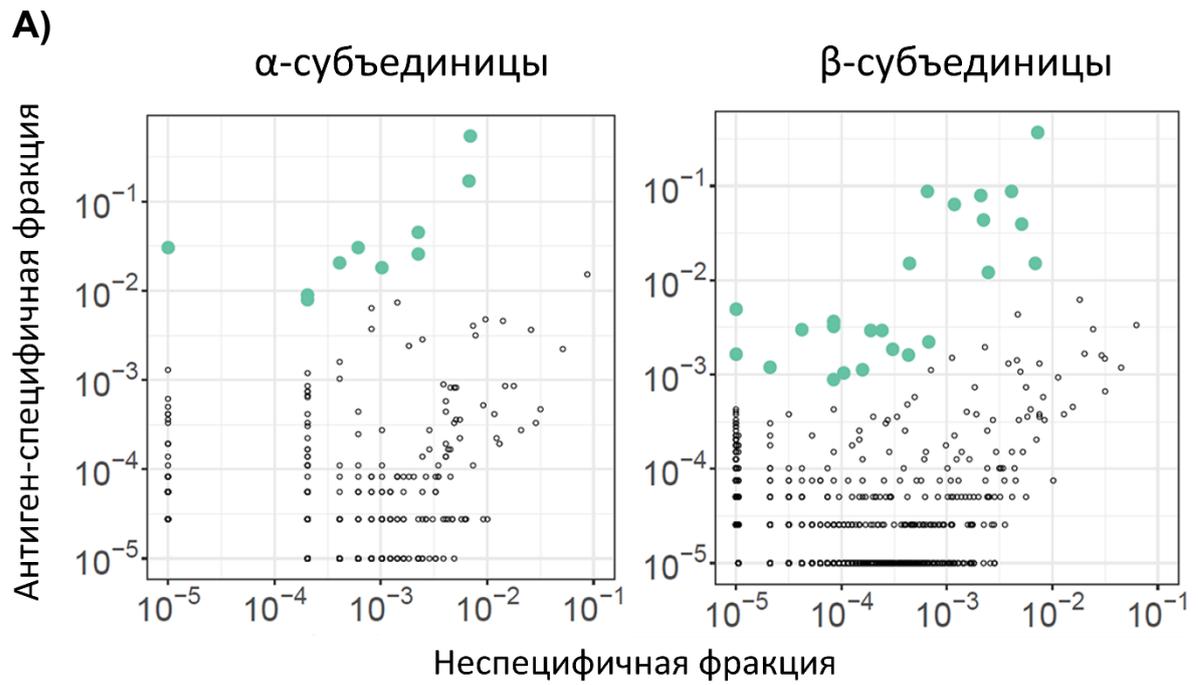


Рисунок 12. График обогащения α - и β -субъединиц ТКР в антиген-специфичной фракции Т-клеток. (А) Репрезентативный график сравнения частоты субъединиц для

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 α -субъединиц и 68 β -субъединиц как потенциально принадлежащие НА-1-специфичным ТКР. Из-за возможных искажений при секвенировании и пробоподготовке, в некоторых культурах определялись как антиген-специфичные только α или только β субъединицы, а в других культурах сразу несколько α и β субъединиц (как например в культуре ячейки 15 из донора р005). Для клонирования и сборки ТКР брали только последовательности из тех культур, в которых были найдены как α , так и β субъединицы, предположительно принадлежащие НА-1-специфичным ТКР. Аминокислотные последовательности CDR3, а также V и J гены субъединиц ТКР, клонированных в вектор для дальнейшего исследования, приведены в таблице 3 приложения.

Одна из метрик, которыми можно описать репертуар ТКР – это степень гомологии последовательностей CDR3 в α и β субъединицах. Для этого между аминокислотными последовательностями CDR3 измеряется расстояние Левенштейна, и затем формируются кластеры гомологии последовательностей CDR3, расстояние между которыми меньше заданной величины. В нашем анализе, для того чтобы две последовательности CDR3 считались гомологичными, допускалось не более 3 аминокислотных различий между ними. Как известно, именно CDR3 отвечает за взаимодействие пептидного антигена и ТКР. Построение кластеров гомологии последовательностей CDR3 позволяет оценить разнообразие способов, которыми ТКР в принципе может распознать конкретный пептидный антиген. Кластерный анализ последовательностей CDR3 из ТКР, предположительно специфичных к НА-1, представлен на рисунке 13.

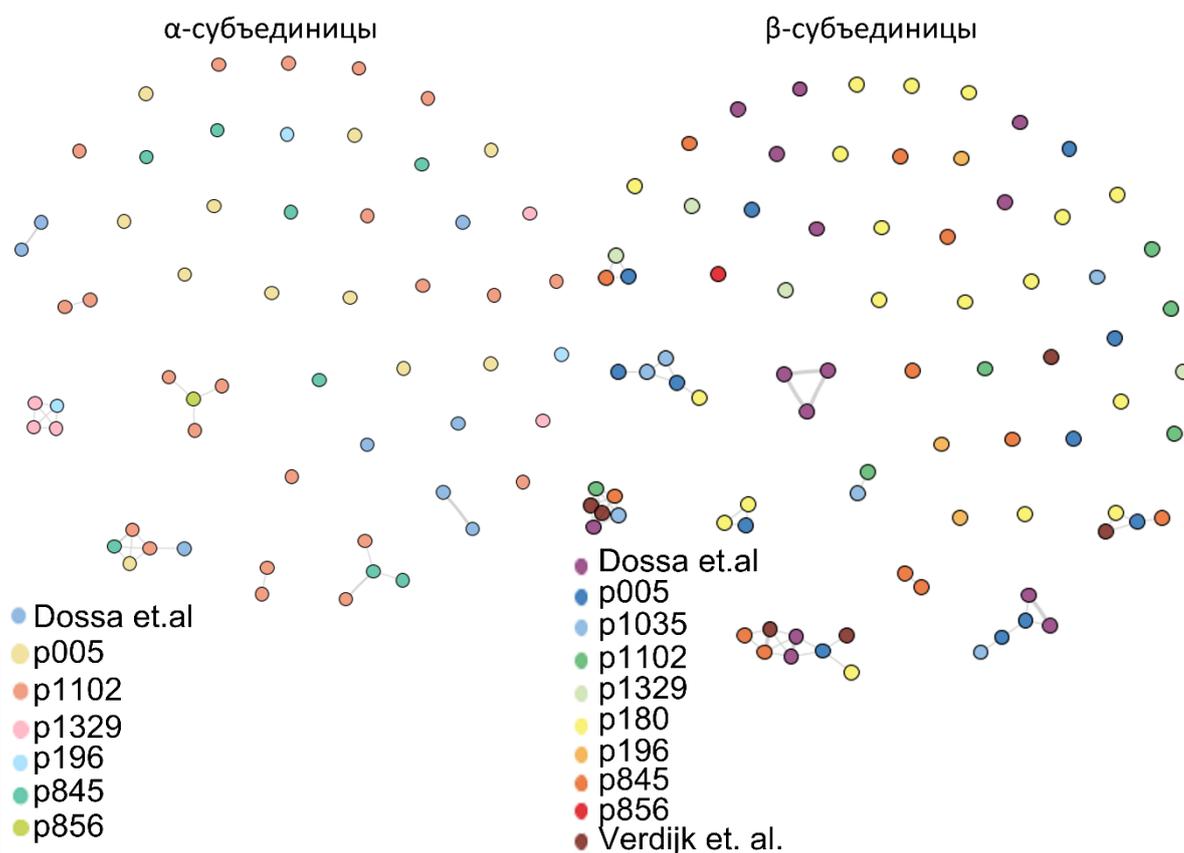
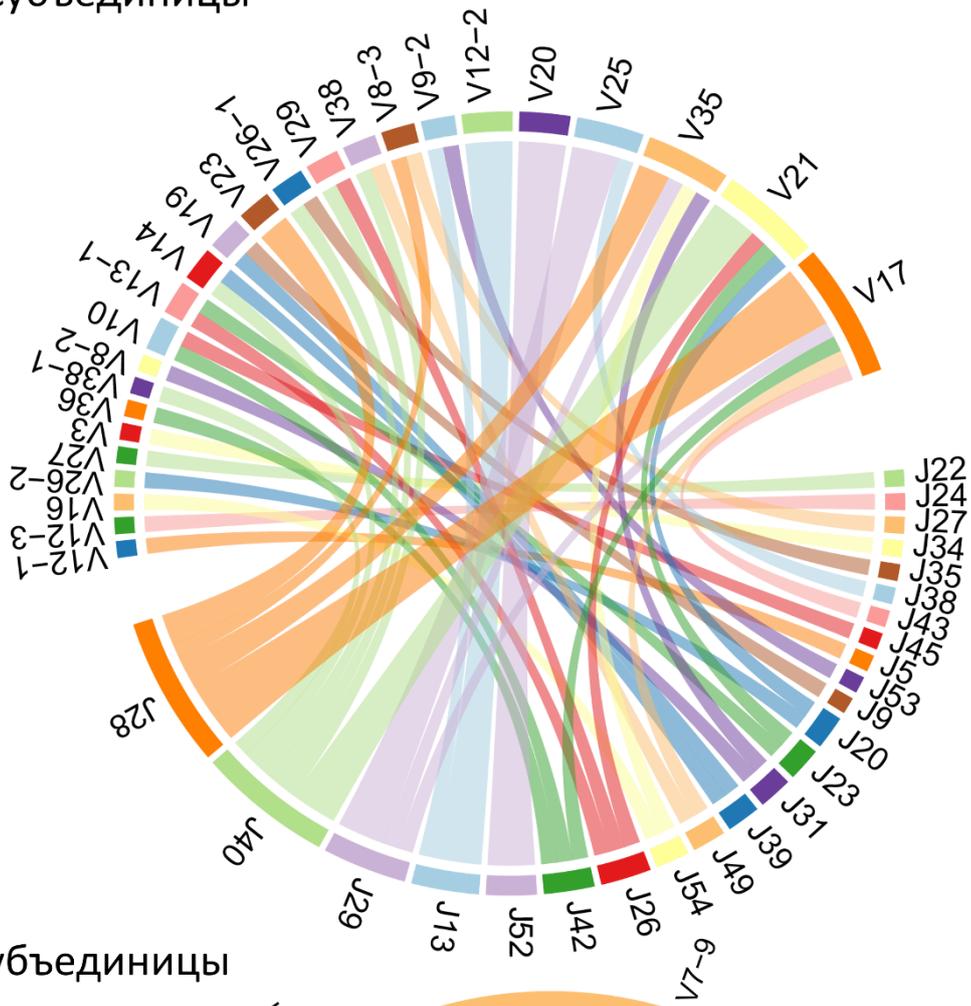


Рисунок 13. Кластерный анализ аминокислотных последовательностей CDR3 ТКР, специфичных к HA-1 в метрике расстояния Левенштейна, для α - и β - субъединиц. Каждая индивидуальная последовательность CDR3 представлена кругом на диаграмме. Соединяющая линия между кругами означает расстояние между последовательностями CDR3 не более 1-3 аминокислотных замен. Разными цветами обозначено происхождение из разных доноров. В анализ включены полученные нами последовательности CDR3, а также опубликованные в [151,179].

Каждая уникальная последовательность CDR3 представлена на графике точкой, цвет точки обозначает источник этой последовательности (периферическая кровь исследованного нами донора или опубликованные ранее данные). Из графиков следует, что в целом последовательности CDR3 сильно отличаются друг от друга, однако встречаются несколько небольших кластеров гомологии. Не было встречено одинаковых последовательностей у разных доноров, то есть так называемых публичных клонов, что свидетельствует об относительно большой степени уникальности HA-1-специфичных ТКР. Следует также понимать, что представленные на рисунке 13 последовательности отобраны биоинформатическим анализом, и чтобы строго считать их принадлежащими HA-1-специфичным ТКР, необходима функциональная проверка ТКР из комбинаций этих субъединиц. В целом,

даже с учетом того, что некоторые последовательности могли быть ошибочно идентифицированы как принадлежащие HA-1-специфичным ТКР, можно говорить о высокой степени уникальности репертуара HA-1-специфичных ТКР, что свидетельствует о большом разнообразии способов, которыми ТКР может распознать пептид HA-1 в контексте молекулы HLA-A*02. Наиболее часто встречаемым варибельным геном β -субъединиц был *TRBV7-9* (рис. 14), что указывает на важность C-терминальных аминокислот этого гена в распознавании пептида HA-1. Частота генов *TRAV* в репертуаре HA-1 специфичных ТКР была более равномерной (рис. 14). Анализ сцепленности V и J генов не выявил какой-либо комбинации, встречающейся значительно чаще других.

α-субъединицы



β-субъединицы

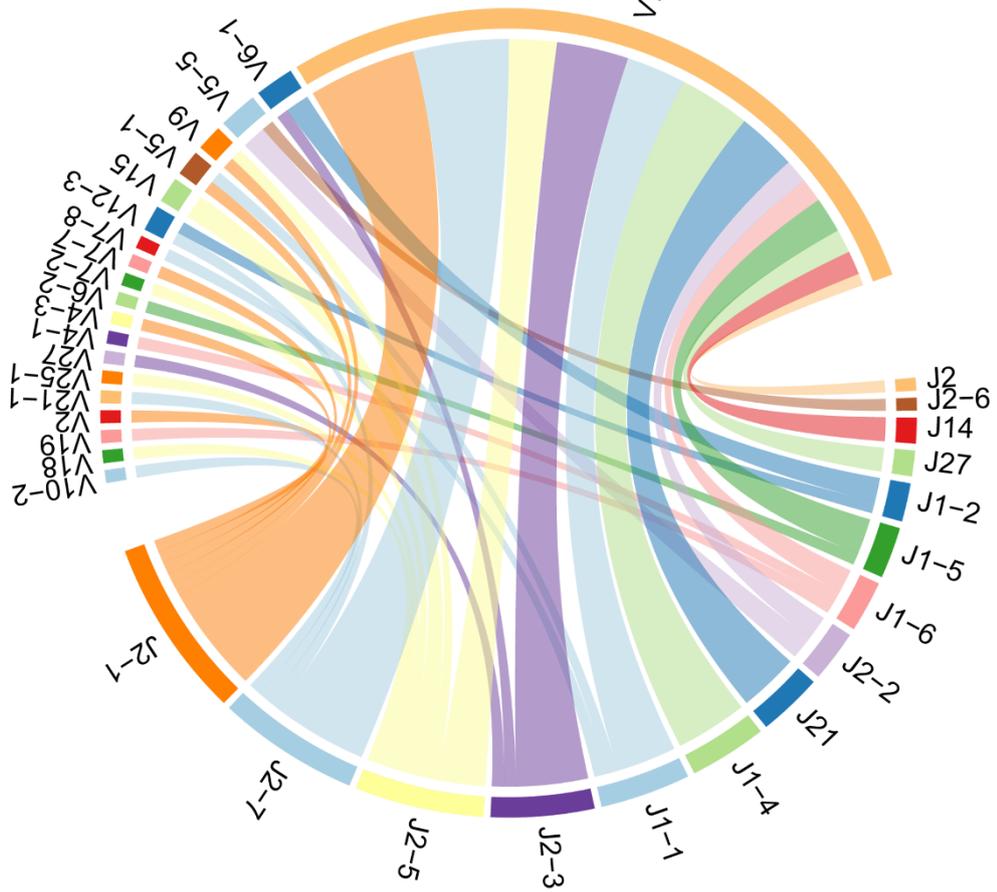


Рисунок 14. Частота встречаемости V генов в бета цепях ТКР и их сцепленность с J генами в α - и β -субъединицах ТКР. Размер сегментов окружности пропорционален доле конкретного гена в репертуаре, толщина соединяющих линий пропорциональна доле сочетания конкретной пары V и J генов в репертуаре.

Мы провели сравнение разнообразия генов TRBV между совокупностью исследованных нами репертуаров HA-1-специфичных ТКР и опубликованными ранее репертуарами ТКР, специфичных к вирусным эпитопам. Опубликованные репертуары брали из базы VDJdb. Мерой оценки разнообразия служил индекс Шеннона, большее значение индекса соответствует большему разнообразию внутри системы. По сравнению с хорошо изученными репертуарами ТКР, специфичных к эпитопам цитомегаловируса (антигены KLG и NLV) и вируса Эпштейна-Барр (антиген AFV), в HA-1-специфичном репертуаре ТКР гены TRBV имели значительно меньшее разнообразие по сравнению с другими репертуарами (индекс разнообразия Шеннона 1,6) (рис.15), что связано с большой представленностью гена *TRBV7-9*. Аналогично низкое разнообразие TRBV наблюдалось в GIL-специфическом репертуаре (вирус гриппа А). Для генов

TRAV индекс разнообразия существенно не различался между репертуарами (индекс разнообразия Шеннона 3.3).

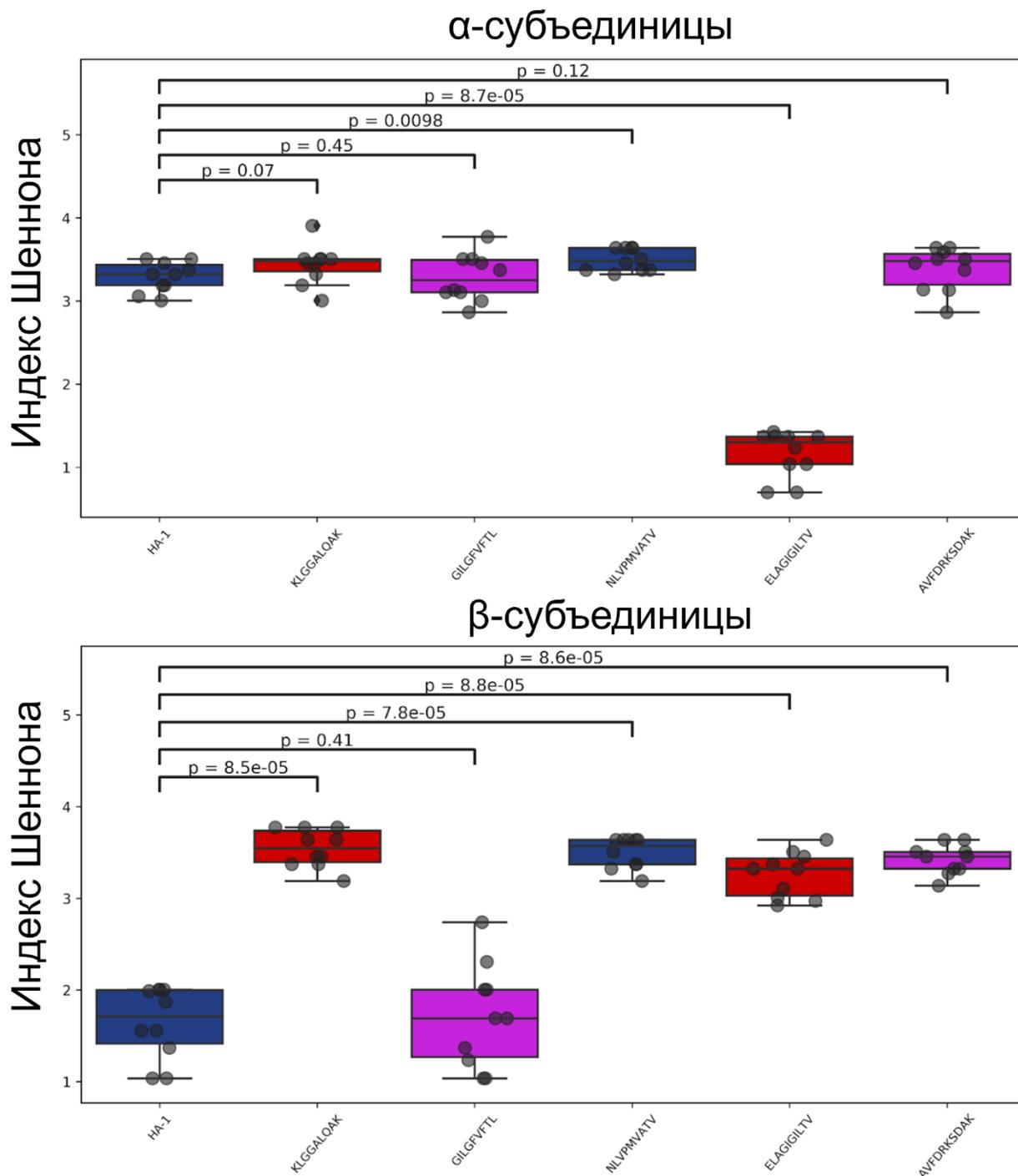


Рисунок 15. Индекс разнообразия Шеннона генов TRAV и TRBV в HA-1-специфичном репертуаре ТКР. Проводили сравнение с репертуарами, специфичными к другим эпитопам: KLG (цитомегаловирус), GIL (вирус гриппа А), NLV (цитомегаловирус), ELA (белок MLANA, *Homo Sapiens*), AVF (вирус Эпштейна-Барр). Данные были получены из базы VDJdb (<https://vdjdb.cdr3.net>). Последовательности ТКР были случайным образом разделены на 9 выборок, индекс Шеннона был рассчитан для каждой выборки отдельно и нанесен на график вместе с рассчитанным р-значением (t-критерий Стьюдента), распределение значений индекса Шеннона во всех выборках соответствовало нормальному. Горизонтальная черта обозначает медиану, границы диаграммы определены

нижними и верхними квантилями. Верхняя и нижняя горизонтальные черты обозначают максимальное и минимальное значение в выборке.

Длина CDR3 варьировала от 11 до 17 аминокислот для β субъединиц и от 8 до 19 для α субъединиц. Распределение соответствовало нормальному, с модой в 13 аминокислот для β -субъединиц (n=35) и 14 аминокислот для α -субъединиц (n=14) (рис.16).

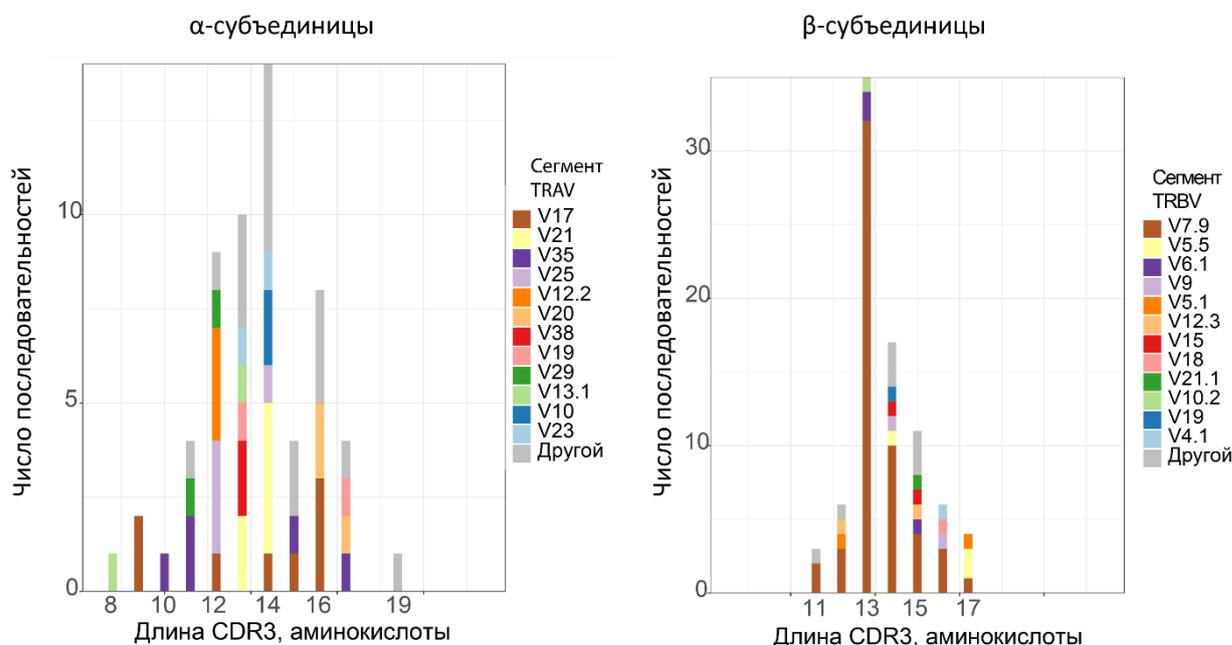


Рисунок 16. Распределение длины CDR3 ТКР, специфичных к НА-1. Цветом отмечена доля конкретного гена TRAV или TRBV в распределении.

3.4 Исследование на модели репортерных клеток J76 выявило 13 функциональных НА-1-специфичных ТКР

Нами было проведено функциональное исследование панели ТКР с использованием репортерных лимфоцитов, экспрессирующих трансгенный слитный белок CD2-CD28 и гетеродимер CD8 $\alpha\beta$. Использование данных корецепторов в репортерных клетках позволяет усилить их чувствительность к стимуляции. Для создания панели НА-1-специфичных ТКР нами была использована библиотека векторов, содержащая 25 α субъединиц и 29 β субъединиц ТКР, происходящих из 5 доноров. Были собраны 48 лентивирусных конструкторов, несущих трансгенные ТКР. Информация о каждой клонированной субъединице ТКР и каждом конструкторе с трансгенным ТКР приведена в таблице 4 приложения. Для сборки ТКР использовали только

пары субъединиц, происходящие из одной культуры. Поскольку в некоторых культурах несколько α и β 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 J76, экспрессирующих трансгенные ТКР. Чтобы нивелировать возможные искажения измерения аффинности ТКР, вызванные разницей в среднем количестве провируса между культурами и как следствие разным количеством трансгенных молекул ТКР на поверхности клеток, трансдукции были проведены при соотношении одна вирусная частица на пять клеток. Согласно распределению Пуассона, такое соотношение гарантирует не более одной интеграции вектора на одну клетку. 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.

3.5 Изучение свойств ТКР, специфичных к HA-1, на модели репортерных лимфоцитов, выявило наиболее аффинные ТКР, не обладающие аллореактивностью HLA-A*02

Аффинность - одна из важнейших метрик, которыми можно охарактеризовать ТКР. В контексте этой работы, под аффинностью ТКР мы понимаем чувствительность ТКР к стимуляции комплексами HLA-пептид, то есть чем больше аффинность ТКР, тем меньшее количество пептида требуется для активации лимфоцита, и тем большее количество лимфоцитов может быть активировано одним и тем же количеством комплексов HLA-пептид. Аффинность ТКР имеет большое значение для Т-клеточной терапии,

поскольку количество пептидного антигена на поверхности клетки очень невелико. Для оценки функциональной аффинности HA-1-специфичных ТКР, специфичных к HA-1, репортерные клетки J76 стимулировали клетками K562, презентирующими 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 GFP-позитивных клеток для каждой экспериментальной точки и строили кривые титрования. Было проведено два независимых эксперимента, репрезентативные кривые приведены на рисунке 17. Измеренный по двум независимым экспериментам диапазон аффинности для HA-1-специфичных ТКР представлен на рисунке 18.

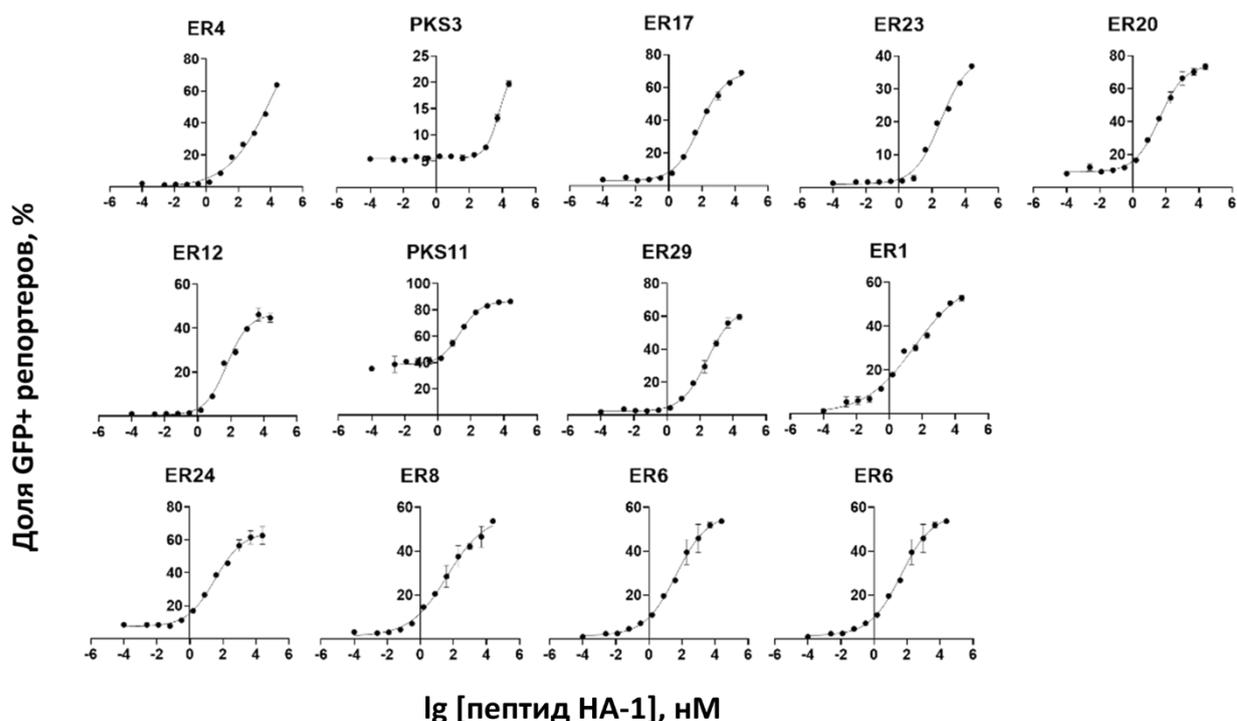


Рисунок 17. Репрезентативные кривые титрования измерения аффинности трансгенных HA-1-специфичных ТКР. На оси ординат отложен процент GFP⁺ клеток J76 по данным проточной цитофлуориметрии. Трансгенные клетки J76, экспрессирующие трансгенные HA-1-специфичные ТКР, стимулировали клетками линии K562, презентирующими 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.

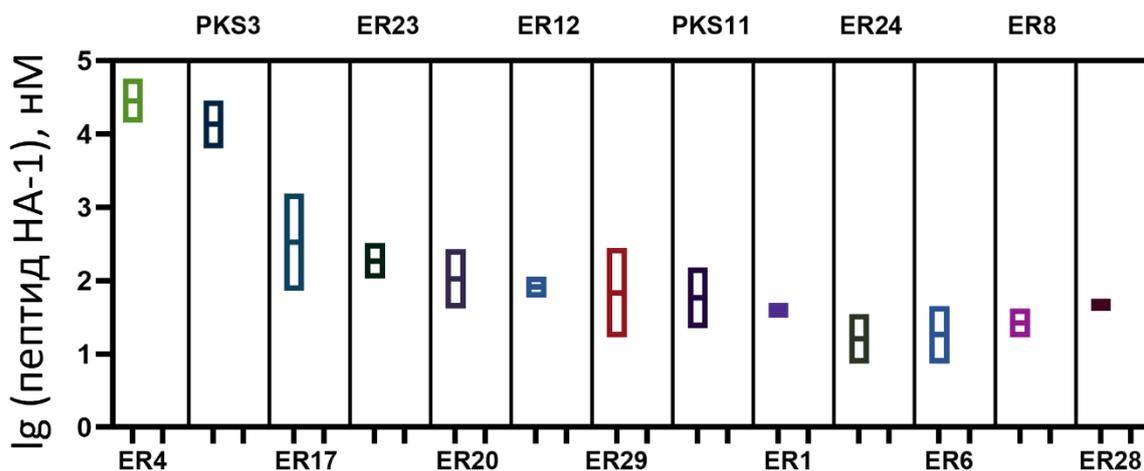


Рисунок 18. Оценка аффинности HA-1-специфичных ТКР. Трансгенные клетки J76, экспрессирующие трансгенные HA-1-специфичные ТКР, стимулировали клетками линии K562, презентующими пептид HA-1 в контексте молекул HLA-A*02. Средние значения аффинности ТКР, выраженные в lg (EC₅₀) для каждого ТКР, были получены 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 HA-1 (рис. 18). У высокоаффинных ТКР, к которым можно причислить ER20, ER12, ER29, PKS11, ER1, ER24, ER6, ER8 и ER28, кривая титрования вышла на верхнее плато (рис.17) 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.

Измеренная нами относительная функциональная аффинность, однако, не тождественна термодинамической аффинности связывания молекулярных комплексов ТКР-HLA-пептид. ТКР может связываться с антигеном с низкой константой диссоциации (то есть с высокой термодинамической аффинностью), но такое сильное взаимодействие не приводит к эффективной активации внутриклеточных каскадов [180]. Так, согласно теории, называемой kinetic proofreading, для успешной активации Т-клетки, необходимо несколько циклов последовательной ассоциации и диссоциации ТКР с комплексом

пептид-HLA, а при низкой константе диссоциации ТКР с комплексом пептид-HLA этот процесс диссоциации затруднен, что в итоге приводит к менее эффективной активации Т-клетки [180].

Окраска мультимерными комплексами HLA-пептид позволяет оценить термодинамическую аффинность ТКР, чем больше интенсивность окрашивания – тем больше аффинность. Окраска клеточных культур J76, экспрессирующих HA-1-HLA-A*02:01 декстрамером (Immudex, Дания) показала расхождения с измерением функциональной аффинности. Например, клетки с рецепторами ER6, ER8 и ER29 по результатам титрования показали относительно низкое значение EC_{50} , и эти ТКР были определены как более аффинные. В то же время культуры с этими ТКР показали низкие уровни связывания декстрамера (рис.19). Клетки с низкоаффинными рецепторами ER4, PKS3, ER17 и ER23 показали уровень окраски декстрамером практически неотличимый от уровня отрицательного контроля. Однако необходимо помнить, что именно функциональная аффинность является наиболее важной характеристикой ТКР-[181]. Примечательно, что хотя ТКР ER17 и ER29 были получены из фракции клеток, связавшихся с тетрамером, трансгенные лимфоциты J76 с этими ТКР не окрашивались декстрамером. Вероятно, это несоответствие может быть объяснено особенностями модели репортерных клеток J76: уровень экспрессии трансгенного ТКР в клетках репортерной линии может отличаться от уровня экспрессии нативного ТКР с теми же генами TRAV и TRBV в первичных CD8⁺ Т-лимфоцитах. Тем не менее, при отборе ТКР для дальнейшего изучения, мы ориентировались как на функциональную аффинность, так и на уровень окраски культуры декстрамером.

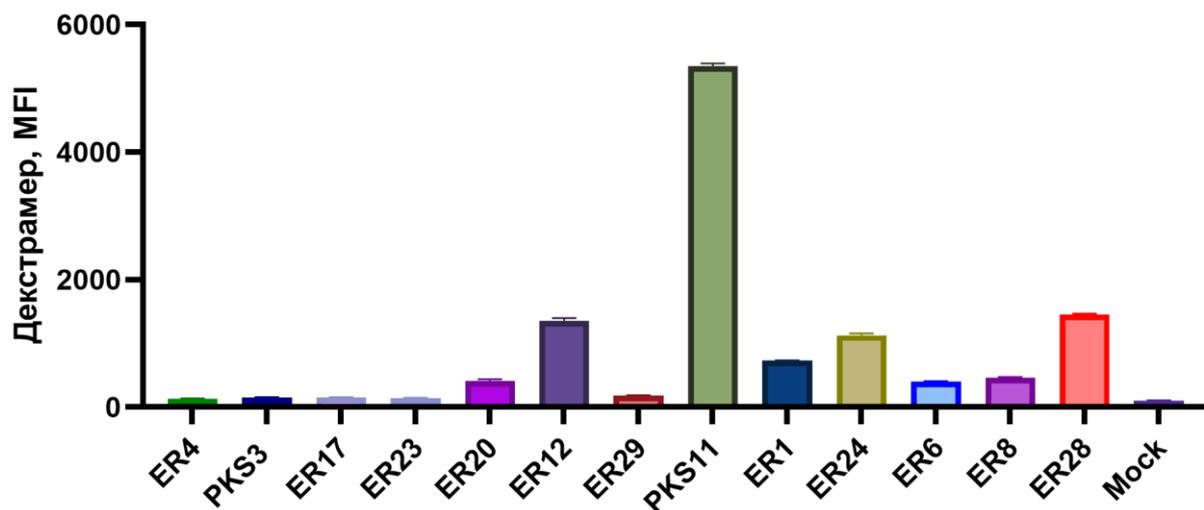


Рисунок 19. Окрашивание репортерных клеточных линий J76 HA-1 HA-1-HLA-A*02:01 декстрамером. Показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) клеток из трех независимых окрашиваний; планки погрешностей означают абсолютную ошибку среднего.

В целом, порядок аффинности ТКР, специфичных HA-1 соответствует типичным для ТКР аффинностям 10-100 мкМ [182]. Наибольший уровень окраски декстрамером из исследованных ТКР демонстрировала культура с ТКР PKS11, полученным из аллогенной экспансии. Также PKS11 показал высокий уровень функциональной аффинности. Однако, как видно из кривой титрования для PKS11, 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. Для проверки этой гипотезы мы провели инкубацию репортерных лимфоцитов, экспрессирующих трансгенный ТКР PKS3, с периферическими мононуклеарами трех доноров с фенотипом HLA-A*02⁺ HA-1⁺, трех доноров с фенотипом HLA-A*02⁺ HA-1⁻ и трех доноров с фенотипом HLA-A*02⁻ (рис.20). Репортерные лимфоциты, экспрессирующие

рецептор PKC ζ , демонстрировали ответ на клетки с молекулами HLA-A*02, независимо от наличия у них пептида HA-1. При этом репортерные лимфоциты не демонстрировали ответ на клетки без молекул HLA-A*02, что свидетельствует об аллореактивности ТКР PKC ζ на молекулы HLA-A*02. Следовательно, хотя PKC ζ обладает высокой аффинностью, он не подходит для Т-клеточной терапии.

В теории, в репертуаре ТКР доноров, негативных по конкретному аллелю HLA, присутствует большое количество высокоаффинных ТКР, способных распознать антиген в молекулах этого аллеля HLA [177,178]. Согласно гипотезе авторов приведенных исследований, ТКР у доноров, негативных по конкретному аллелю HLA, не проходили отрицательной селекции на презентруемые в молекулах HLA этого аллеля пептиды, поэтому у таких доноров могут быть обнаружены наиболее высокоаффинные клоны. К сожалению, наша выборка аллогенных экспансий была очень мала, и хотя один из двух полученных из аллогенной экспансии ТКР действительно обладал наибольшей аффинностью среди всех исследованных ТКР, он также был аллорективным. По-видимому, для детекции не являющегося аллореактивным ТКР из аллогенных экспансий требуется скрининг большого количества ТКР. Таким образом, выбор ТКР для дальнейших исследований ограничивался только ТКР, полученными из аутологичных экспансий. Все высокоаффинные ТКР, к которым можно причислить ER20, ER12, ER29, ER1, ER24, ER6, ER8 и ER28, продемонстрировали приблизительно одинаковый порядок функциональной активности, однако наибольшую интенсивность окраски декстрамером показали клетки с ТКР ER24, ER28 и ER12. Для дальнейшего изучения мы ориентировались на результаты окраски декстрамером и на результаты стимуляции. Мы отобрали три высокоаффинных ТКР, два из которых показали высокую функциональную аффинность и интенсивность окраски декстрамером (ER12, ER28), а третий, ER6, высокую функциональную аффинность и низкую интенсивность окраски декстрамером.

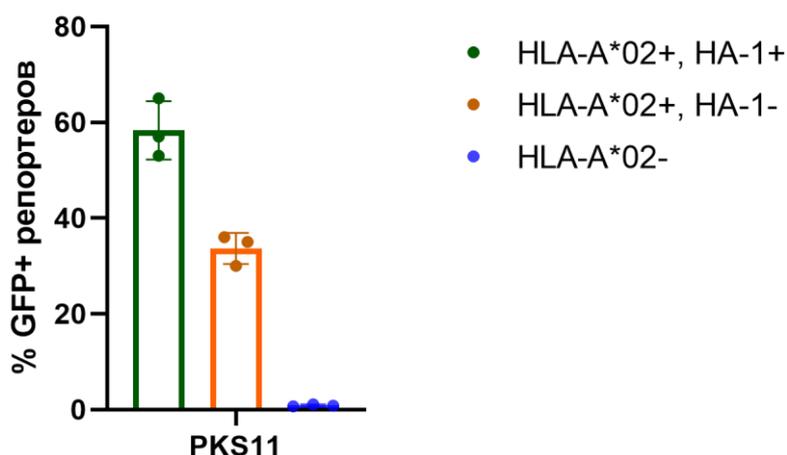


Рисунок 20. Стимуляция репортерных клеток, экспрессирующих аллореактивный ТКР PKS11. Указан процент активировавшихся репортеров. Исследован ответ на периферические мононуклеары доноров, презентующие пептид HA-1 в контексте молекул HLA-A*02, либо имеющих только молекулы HLA-A*02, либо не имеющих HLA-A*02. В каждой группе для стимуляции использовали клетки трех доноров. Планка погрешности обозначает абсолютную ошибку среднего.

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

Поиск ТКР из репертуара наивных CD8⁺ 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 [183]. 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. 21А), и пациентов со злокачественными новообразованиями крови (рис. 21Б). 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⁺ HA-1^{+/+}), имеющие аллель HLA-A*02 гетерозиготы по иммуногенному аллелю HA-1 (HLA-A*02⁺ HA-1^{+/-}), имеющие аллель HLA-A*02 гомозиготы по неиммуногенному аллелю HA-1 (HLA-A*02⁺ HA-1^{-/-}), 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.

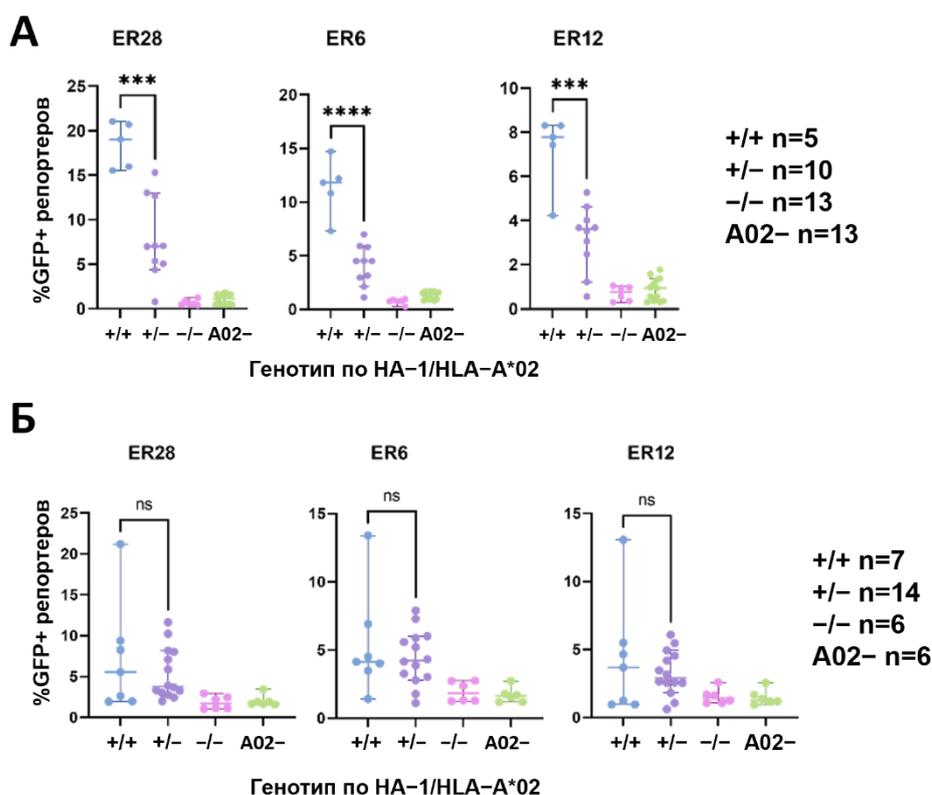


Рисунок 21. Репортерные клетки J76, экспрессирующие трансгенные ТКР ER28, ER6 ER12 демонстрируют ответ на HA-1-позитивные периферические мононуклеары здоровых доноров (А) и пациентов со злокачественными новообразованиями крови (Б). Каждая точка означает средний процент GFP⁺ репортерных клеток между тремя 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^{+/+} и 9 из 10 доноров, имеющих генотип HA-1^{+/-}, тогда как при стимуляции клетками доноров с генотипами HA-1^{-/-} или

HLA-A*02⁻ не наблюдалось активации. Стимуляция клетками здоровых доноров с генотипом HA-1^{+/+} активировала больший процент репортерных Т-клеток по сравнению со стимуляцией клетками с генотипом HA-1^{+/-}, 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. 21Б).

Стимуляция клетками пациентов приводила в среднем к меньшему проценту активированных репортерных лимфоцитов. Клетки трёх пациентов с генотипом HA-1^{+/+} и восьми с генотипом HA-1^{+/-} вообще не были способны активировать репортерные лимфоциты до уровня, отличимого от стимуляции клетками с генотипами HA-1^{-/-} или HLA-A*02⁻. Этот эффект может объясняться экспрессией опухолевыми клетками ингибирующих иммунный ответ молекул, в частности PD-L1. Было показано, что экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках ингибирует активацию клеток Jurkat [184].

Другой возможный механизм ухода опухолевых клеток от иммунного ответа - снижение экспрессии HLA [185]. Действительно, мы наблюдали, что периферические мононуклеары пациентов со злокачественными новообразованиями крови в среднем имеют более низкий уровень экспрессии HLA-A*02:01 по сравнению с клетками здоровых доноров (рис. 22). Еще одно возможное объяснение меньшего процента репортерных лимфоцитов, активируемых клетками опухоли, заключается в меньшем уровне экспрессии ARHGAP45 в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми клетками, согласно базе данных bloodspot.eu. (рис. 1 приложения). Хотя объяснение меньшей иммуногенности периферических мононуклеаров пациентов со злокачественными новообразованиями крови благодаря экспрессии ингибиторных молекул и меньшему уровню экспрессии молекул HLA кажется наиболее вероятным, нельзя исключать и другие механизмы ухода от иммунного ответа.

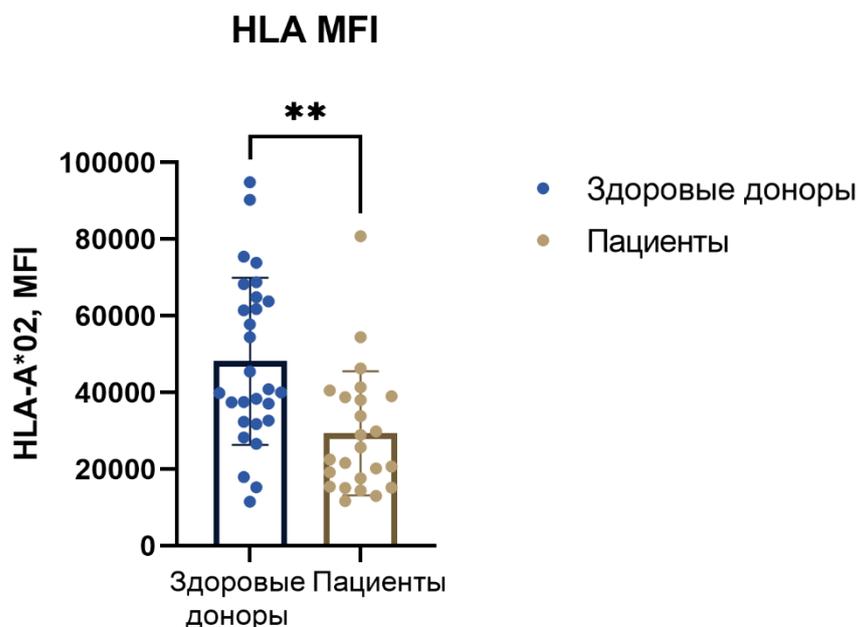


Рисунок 22. Периферические мононуклеары пациентов со злокачественными новообразованиями крови демонстрируют более низкий уровень окрашивания на HLA, чем периферические мононуклеары здоровых доноров. Показана средняя интенсивность флуоресценции HLA-A*02 на клетках здоровых доноров и пациентов со злокачественными новообразованиями крови, измеренная с помощью проточной цитофлуориметрии. Высота столбца соответствует медианному значению, планки погрешностей обозначают абсолютную ошибку среднего. Статистическая значимость: U-критерий Манна-Уитни $**p=0,017$

При стимуляции репортерных лимфоцитов периферическими мононуклеарами здоровых доноров и пациентов, наибольший процент активированных клеток наблюдали в культуре с трансгенным ТКР ER28. Следующей по проценту активированных лимфоцитов была культура с ТКР ER6, хотя эта культура и показала невысокий уровень окраски декстрамером. Культура с трансгенным ТКР ER12 напротив, показала практически равный уровень окраски декстрамером с культурой, несущей ТКР ER28, но процент активированных лимфоцитов при стимуляции в культуре ER12 был в два раза меньше, чем в культуре ER28. Таким образом, изучение трансгенных ТКР на более далеких от физиологических условий моделях (окраска мультимерами HLA-пептид, стимуляция репортерных лимфоцитов клеточной линией, презентующей экзогенный пептид), позволяет лишь приблизительно оценить эффекторные качества ТКР. Однако опыты на таких моделях нужны для первоначального отбора ТКР для дальнейшего изучения.

Для более точной оценки свойств трансгенного ТКР необходимо использование более приближенной к реальным условиям модели.

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 (таблица 6). Ни один из исследованных ТКР не проявлял активации при стимуляции клетками, экспрессирующими молекулы HLA указанных аллелей. Таким образом мы показали, что ни один из отобранных нами ТКР не обладает кроссреактивностью на распространенные аллели 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.

Таблица 6. Количество доноров с различными аллелями HLA, протестированными на аллореактивность.

HLA	Доноры, кол-во	HLA	Доноры, кол-во	HLA	Доноры, кол-во
A*01	14	B*07	3	C*02	2
A*03	3	B*08	8	C*03	5
A*11	1	B*13	1	C*04	3
A*24	5	B*14	1	C*05	1
A*25	2	B*15	1	C*06	2
A*26	3	B*27	2	C*07	9
A*31	1	B*35	5	C*08	1
A*32	1	B*37	2	C*12	3
A*33	2	B*39	3	C*14	1
A*68	1	B*40	4	C*16	2
		B*41	2	C*17	1
		B*49	1		

		B*44	2		
		B*51	1		
		B*52	1		
		B*57	2		

3.7 Изучение эффективности CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР на клетках Jurkat E6-1

При модификации Т-клеток трансгенным ТКР возникает проблема: нативные и трансгенные субъединицы ТКР могут формировать гетеродимеры, в которых одна субъединица имеет эндогенное происхождение, а другая – трансгенное. Как упоминалось ранее, образующиеся гетеродимеры ТКР могут быть аутореактивны [159]. Кроме того, в клетке присутствует ограниченное количество молекул CD3, и трансгенным субъединицам ТКР приходится конкурировать за CD3 с эндогенными субъединицами ТКР. CRISPR/Cas нокаут эндогенного ТКР позволяет убрать эту конкуренцию и увеличить присутствие молекул трансгенного ТКР на поверхности клетки [160].

В нашей работе был использован метод CRISPR/Cas нокаута путем доставки рибонуклеопротеиновых комплексов gRNA-Cas9 в клетку электропорацией. Этот метод доставки более эффективен, чем трансфекция в клетку кодирующей Cas9 мРНК или лентивирусная трансдукция нуклеотидной последовательности Cas9 [186]. Мы провели исследование эффективности CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР, сравнив процент отрицательных по экспрессии ТКР клеток линии Jurkat E6-1 после нокаута. Сравнение проводили между пятью gRNA, гибридизующихся с геномной ДНК в первом экзоне гена TRAC и восемью gRNA, гибридизующихся с геномной ДНК в первом экзоне TRBC1/2. Последовательности были либо взяты из публикаций [160,187], либо предложены программой Synthego (www.synthego.com). Эффективность нокаута сильно варьировала между разными gRNA (таблица 7, рис.23). Максимальный процент нокаута был выше

для gRNA специфичных к TRAC, чем к TRBC1/2. По-видимому, это объясняется тем, что у gRNA, гибридизующихся с нуклеотидными последовательностями TRBC1/2 в 2 раза больше мишеней в геноме, поскольку TRBC1 и TRBC2 имеют высокую степень гомологии. Наибольшую эффективность нокаута продемонстрировали последовательности gRNAa1 и gRNAb5. Эти гайд-РНК были взяты в дальнейшую работу.

Мы проанализированы генетические изменения, произошедшие после редактирования в последовательностях TRAC и TRBC на уровне индивидуальных клеток. После CRISPR/Cas нокаута ТКР в клетках Jurkat E6-1 с использованием gRNAa1 или gRNAb5, отрицательные по экспрессии ТКР клетки сортировали с помощью сортировщика клеток FACS Aria III в 96-ячеечные планшеты в количестве одной клетки на ячейку. Клетки культивировали в течение трех недель, из полученных клонов выделяли ДНК и исследовали изменения в длинах нуклеотидных последовательностей TRAC и TRBC методом фрагментного анализа.

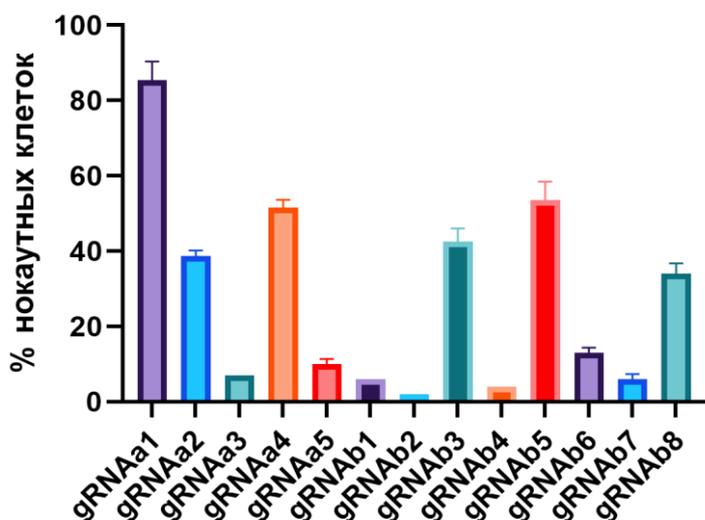


Рисунок 23. Исследование эффективности нокаута различных gRNA на клетках Jurkat E6-1. На графике представлен средний процент нокаутных клеток между тремя независимыми экспериментами по CRISPR/Cas нокауту эндогенного ТКР, планки погрешностей обозначают абсолютную ошибку среднего.

Мы проанализировали 8 клонов с нокаутом TRAC и 8 клонов с нокаутом TRBC1/2. Наиболее часто встречающейся мутацией в гене TRAC была инсерция 1 нуклеотида, а также делеция 6 нуклеотидов. Для TRBC1 и TRBC2

наиболее распространенной мутацией являлась инсерция 1 нуклеотида, более редкое событие - инсерция 2 и 3 нуклеотидов. Следует также отметить, что события, приводящие к делеции или инсерции аминокислот с сохранением рамки считывания все равно приводили к нокаутному фенотипу по ТКР анализируемых клеток Jurkat Е6-1. Практически все исследуемые клоны были гетерозиготны по редактируемому аллелю, то есть имели одновременно аллель дикого типа и модифицированный аллель. Это, вероятно, объясняется тем, что в клетках Jurkat Е6-1 за счет аллельного исключения ТКР только одна копия TRAC и TRBC1 функциональна и потому находится в состоянии открытого хроматина, наиболее доступного для CRISPR/Cas редактирования. Хотя у клеток Jurkat Е6-1 в β -субъединице ТКР используется только TRBC1, во всех клонах нокаут TRBC1 приводил также к редактированию TRBC2. Наиболее вероятно, подвергшийся изменению аллель TRBC2 находится на одной хромосоме с редактируемым TRBC1. По данным литературы, в Т-клетках CRISPR/Cas редактированию как правило подвергается только один аллель, в то время как второй из-за аллельного исключения находится в состоянии гетерохроматина и потому менее доступен для редактирования [188].

Таблица 7. Исследование эффективности нокаута различных gRNA

Название	Целевой ген	Последовательность	Источник	Эффективность нокаута
gRNAa1	TRAC	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA	[187]	86%
gRNAa2	TRAC	GCUGGUACACGGCAGGGUCA	Synthego	37%
gRNAa3	TRAC	CUCUCAGCUGGUACACGGCA	Synthego	7%
gRNAa4	TRAC	UCAGGGUUCTGGAUAUCUGU	[160]	53%
gRNAa5	TRAC	UCUCUCAGCUGGUACACGGC	Synthego	11%

gRNAb1	TRBC1/2	CUUUCAGAGGACCUGAACA	Synthego	6%
gRNAb2	TRBC1/2	CAGGGAAGAAGCCUGUGGCC	Synthego	2%
gRNAb3	TRBC1/2	GUGGUCAGGGAAGAAGCCUG	Synthego	45%
gRNAb4	TRBC1/2	AGGCUUCUCCCUGACCACG	Synthego	4%
gRNAb5	TRBC1/2	CAAACACAGCGACCTTGGGT	[187]	57%
gRNAb6	TRBC1/2	AACACGUUUUCAGGUCCUC	Synthego	14%
gRNAb7	TRBC1/2	CGGGGUAGAAGCCUGUGGCC	Synthego	7%
gRNAb8	TRBC1/2	AGAGAUCUCCACACCCAAA	[160]	36%

3.8 Трансгенный HA-1-специфичный ТКР функционален в CD8⁺ Т-лимфоцитах

Первичные CD8⁺ Т-лимфоциты сложнее модифицировать трансгенными ТКР, чем клетки J76, из-за более низкой эффективности трансдукции. Кроме того, в первичных CD8⁺ Т-лимфоцитах существует конкуренция между трансгенными и эндогенными субъединицами ТКР за связывание с молекулами CD3 и выход на поверхность. Для увеличения присутствия трансгенного ТКР на поверхности клетки можно применять не только CRISPR/Cas нокаут эндогенного ТКР, но и изменять аминокислотную последовательность трансгенных ТКР [168]. Муринизация регионов TRAC и TRBC, то есть замена человеческой аминокислотной последовательности на мышиную, а также внедрение дополнительной цистеиновой связи между субъединицами ТКР широко применяются при создании Т-клеточных терапий. 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 [168–170]. Кроме того, использование муринизированных TRAC и TRBC позволяет непосредственно оценивать эффективность трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

Нами была показана функциональность трансгенных HA-1-специфичных ТКР в первичных CD8⁺ Т-клетках. Из HLA-A*02:01-отрицательного донора выделяли и активировали CD8⁺ Т-клетки, после чего трансдуцировали тремя муринизированными HA-1-специфичными ТКР: ER28, ER6 и ER12. Процент трансдуцированных клеток, оцененный по экспрессии трансгенного ТКР методом проточной цитофлуориметрии, составил 8–9% для всех трех культур (рисунок 24).

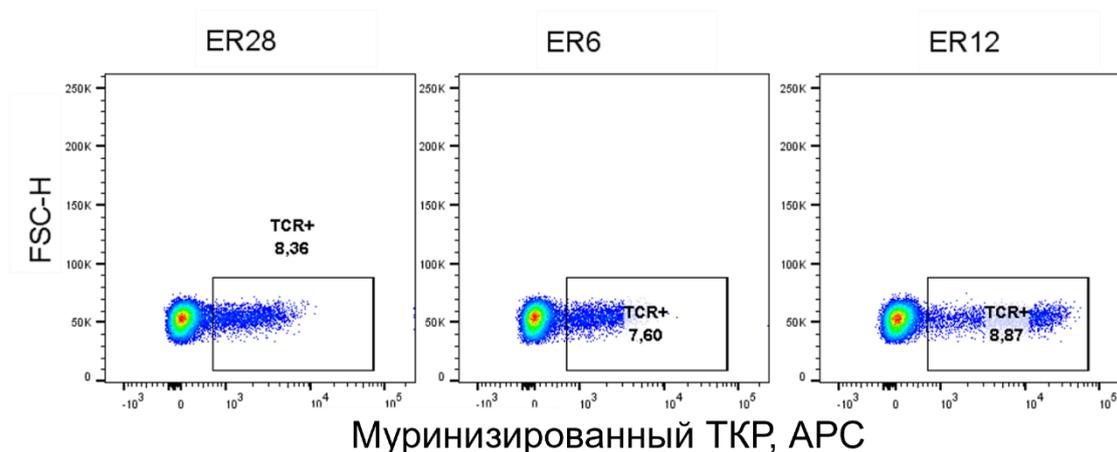


Рисунок 24. Параллельные трансдукции клеток одного донора проходят с одинаковой эффективностью. Экспрессию муринизированных ТКР ER6, ER12 и ER28 в CD8⁺ Т-клетках измеряли методом проточной цитофлуориметрии окраской специфичными к мышиному ТКР антителами через 72 часа после трансдукции.

Трансдуцированные культуры CD8⁺ Т-лимфоцитов стимулировали клетками K562 при разных концентрациях экзогенного пептида HA-1. Трансгенные лимфоциты секретировали IFN-γ при стимуляции экзогенным пептидом HA-1, зависимость количества секретируемого IFN-γ от концентрации пептида описывалась сигмоидальной кривой (рисунок 25).

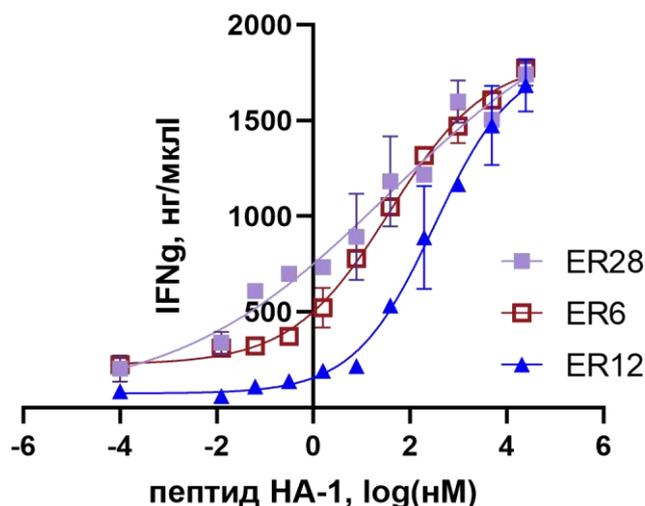


Рисунок 25. CD8⁺ Т-клетки, модифицированные трансгенными HA-1-специфичными ТКР, при стимуляции экзогенным пептидом HA-1, представленным в молекулах HLA-A*02 клетками K562, демонстрируют зависимость от концентрации пептида секрецию IFN-γ. Точками обозначено среднее между тремя техническими повторностями количество IFN-γ, планки погрешности обозначают абсолютную ошибку среднего.

Следует отметить, что количество секретируемого IFN-γ в точке максимальной концентрации пептида было одинаковым для всех трех культур. По результатам эксперимента, CD8⁺ Т-лимфоциты с ТКР ER28 показали наибольшую чувствительность к стимуляции пептидом HA-1, клетки с ТКР ER12 продемонстрировали наименьшую чувствительность к стимуляции. Учитывая интенсивность окрашивания декстрамером репортерных клеток J76 с трансгенными ТКР, а также по результатам изучения функциональной аффинности ТКР, экспериментов по стимуляции клетками крови здоровых доноров и пациентов, а также секреции IFN-γ CD8⁺ Т-лимфоцитами, ТКР ER28 показал наибольшую активность и был выбран как наиболее перспективный кандидат для дальнейшего анализа.

Далее мы показали увеличение количества трансгенного ТКР на поверхности лимфоцитов после CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР с помощью окраски декстрамером. CD8⁺ Т-лимфоциты пяти HLA-A*02:01-отрицательных доноров были модифицированы трансгенным мураинизированным ТКР ER28 лентивирусной трансдукцией. Затем каждая из пяти культур была разделена на две субкультуры, одна из которых

подвергалась нокауту α и β субъединиц эндогенного ТКР электропорацией 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. 26).

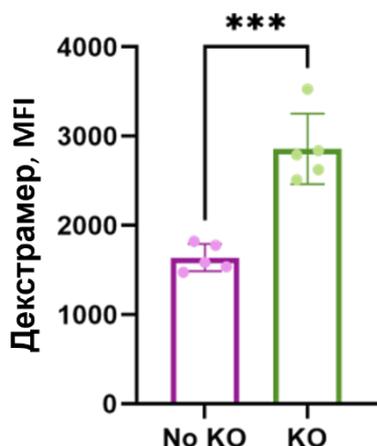


Рисунок 26. Нокаут эндогенного ТКР увеличивает присутствие трансгенного ТКР на поверхности клеток. Представлены результаты окрашивания HA-1-HLA-A*02:01 декстрамером CD8⁺ Т-лимфоцитов пяти доноров, трансдуцированных HA-1-специфичным ТКР ER28, с CRISPR/Cas9 нокаутом эндогенного ТКР (KO) и без (No KO). 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.

3.9 CD8⁺ Т-клетки с мураинизированным трансгенным HA-1-специфичным ТКР и CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР обладают цитотоксичностью в отношении клеток крови HA-1-положительных пациентов с различными онкогематологическими 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⁺ 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⁺ Т-лимфоциты, проводили CRISPR/Cas нокаут эндогенных α - и β -субъединиц ТКР, и трансдуцировали лентивирусным вектором, несущим ТКР ER28. Далее трансгенные клетки сортировали за молекулы трансгенного ТКР. После сепарации клетки культивировали в течение 20 дней, более чем десятикратно увеличив количество отсортированных клеток (рис.27).

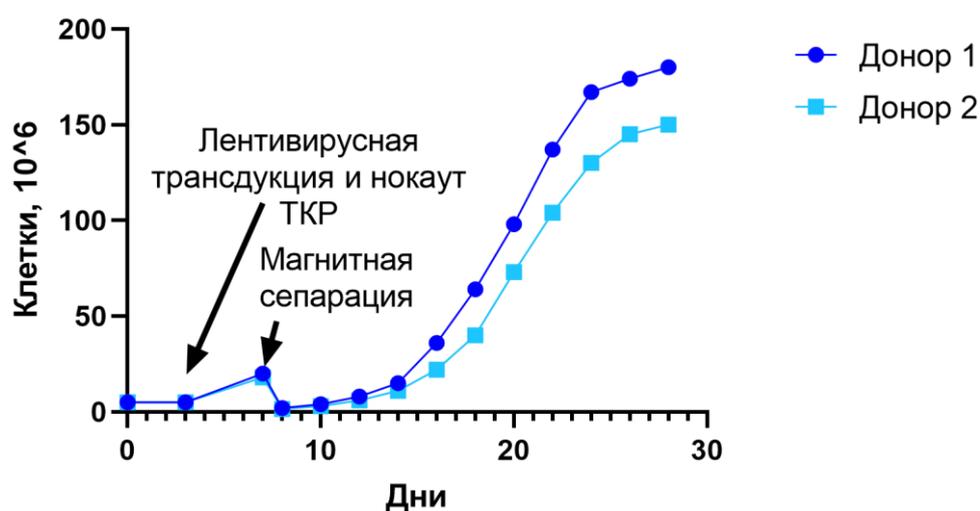


Рисунок 27. Обогащенные магнитной сепарацией CD8⁺ Т-клетки демонстрируют высокий пролиферативный потенциал. Показаны графики для двух доноров. Для каждого донора $5 \cdot 10^6$ CD8⁺ Т-клеток были трансдуцированы и подверглись CRISPR/Cas нокауту эндогенного ТКР на 3-й день после активации, магнитная сепарация за мышинный ТКР была проведена на 7-й день.

Окрашивание отсортированных культур HA-1-HLA-A*02:01 декстрамером через две недели культивации показало, что >90% клеток в обогащенных культурах были специфичны к HA-1 (рис. 28). Можно сделать вывод, что трансген не подвергается значительной эпигенетической репрессии и уровень его экспрессии сохраняется на относительно стабильном уровне [189].

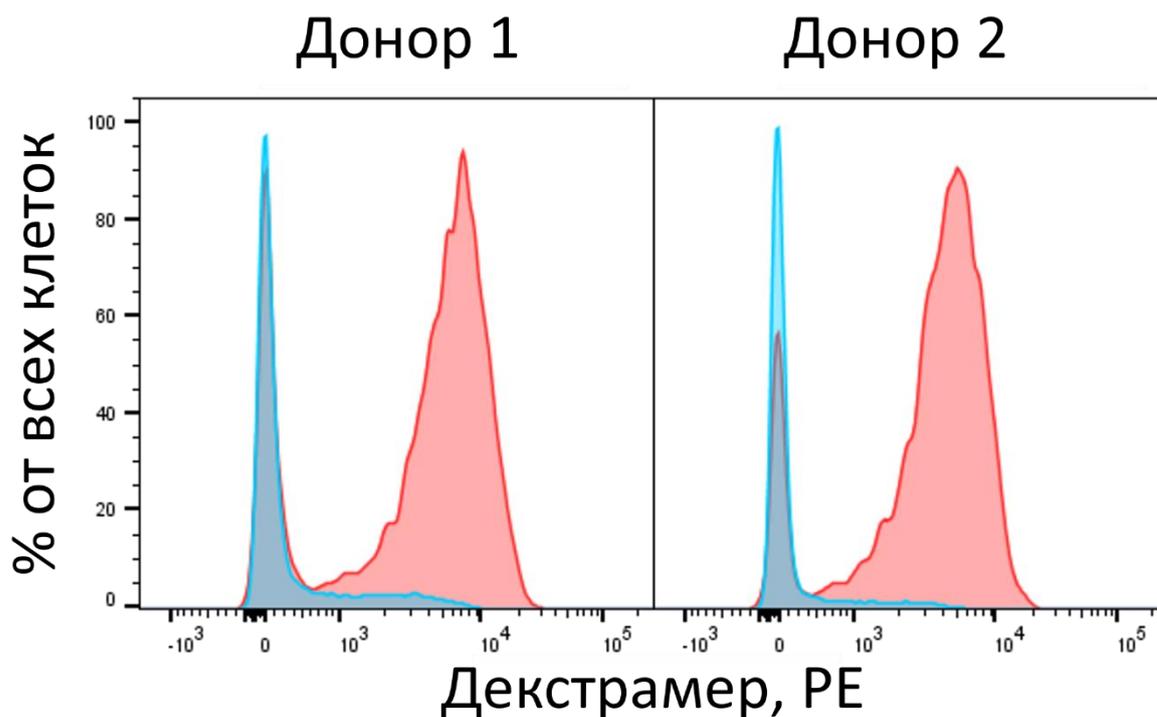


Рисунок 28. Обогащенные культуры трансгенных CD8⁺ Т-лимфоцитов двух доноров сохраняют специфичность к HA-1 после длительной *in vitro* культивации. Окрашивание HA-1-HLA-A*02:01 декстрамером необогащенной культуры (синий цвет) и культуры, обогащенной с помощью иммуномагнитной сепарации экспрессирующих мураинизированный ТКР клеток (красный цвет).

Наконец, нами была показана селективная цитотоксичность трансгенных лимфоцитов в отношении образцов периферической крови пациентов со злокачественными новообразованиями крови. Обогащенные культуры HA-1-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенный ТКР ER28, полученные из двух отрицательных по HLA-A*02:01 здоровых доноров, культивировали с клетками периферической крови пациентов, как описано в материалах и методах. 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⁺ 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^{+/+}, девяти пациентов имели генотип HA-1^{+/-}, четырех – генотип HA-1^{-/-}, также стимуляцию проводили клетками шести пациентов, не имеющих аллеля HLA-A*02:01. Репрезентативные графики цитометрического анализа для двух позитивных по HLA-A*02:01 пациентов с генотипами HA-1^{+/+} и HA-1^{-/-} приведены на рис. 29А. Живые клетки расположены в Q4, клетки, начавшие апоптоз и имеющие активную каспазу расположены в Q1. Клетки, в которых произошла активация каспаз и нарушение целостности мембраны, и как следствие окраска ДНК-интеркалирующим красителем 7AAD, расположены в Q2. Из приведенных графиков видно, что в образцах, где присутствуют только периферические мононуклеары пациентов, большинство клеток сохраняют жизнеспособность. Добавление нетрансдуцированных лимфоцитов не приводит к увеличению процента погибших клеток-мишеней. Инкубация с лимфоцитами, экспрессирующими ТКР ER28, напротив, приводит к значительной гибели позитивных по HA-1 клеток, но не отрицательных по HA-1 клеток. Добавление экзогенного пептида HA-1 к клеткам с генотипом HA-1^{-/-} значительно увеличивало их процент гибели в присутствии лимфоцитов с трансгенным ТКР ER28. Это доказывает, что цитотоксический ответ происходит именно на пептид HA-1. Сравнение процента гибели клеток пациентов с различными генотипами при инкубации с трансгенными лимфоцитами приведено на рис. 29Б. 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.

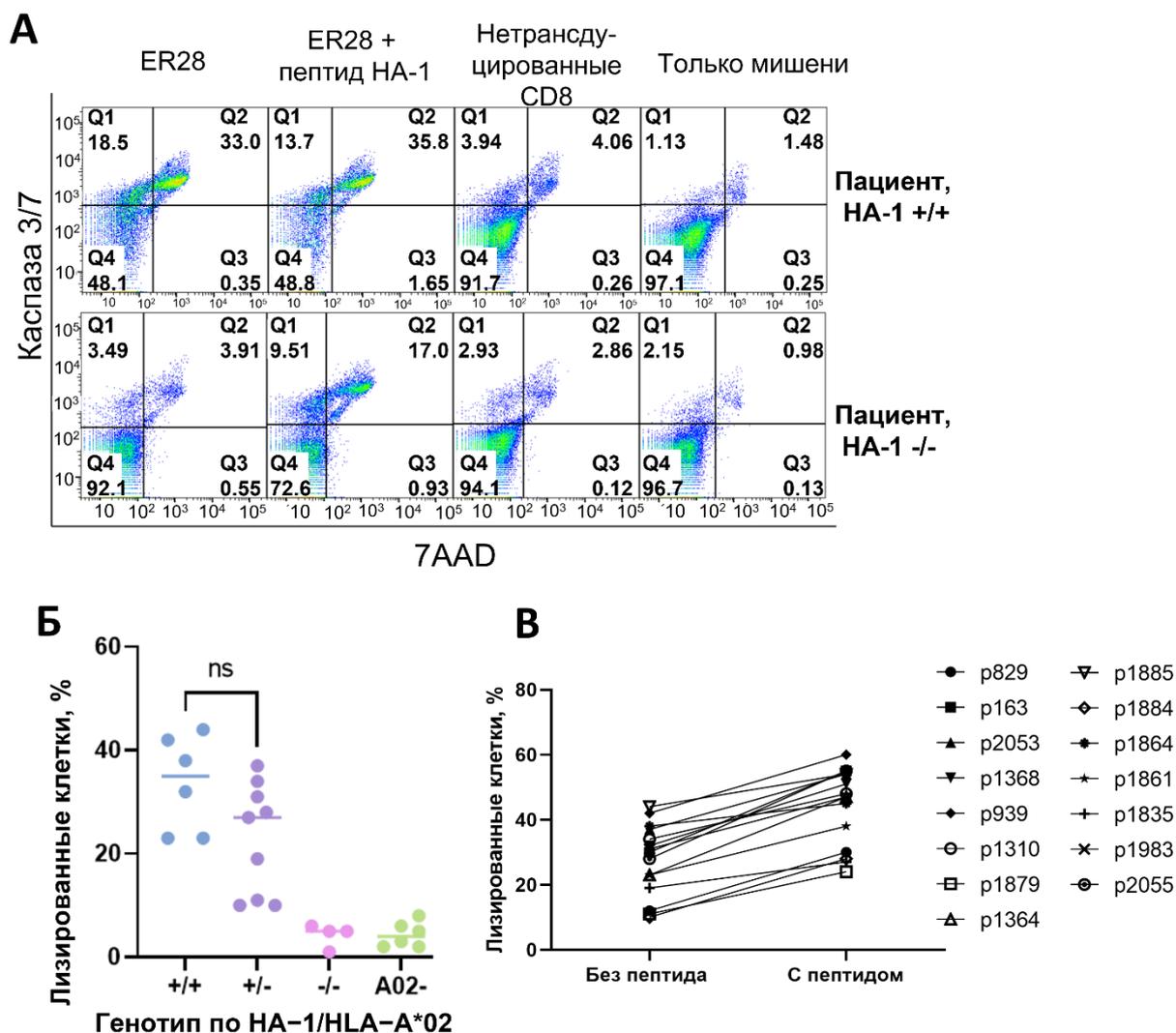


Рисунок 29. Трансгенные HA-1-специфичные CD8⁺ лимфоциты с нокаутом эндогенного ТКР специфически убивают клетки крови HA-1-положительных пациентов. А. Периферические мононуклеары пациентов со злокачественными новообразованиями крови культивировали с трансгенными CD8⁺ Т-клетками, модифицированными ТКР ER28 после CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР. В образцах положительного контроля трансгенные CD8⁺ Т-клетки культивировали с периферическими мононуклеарами тех же пациентов, но с добавлением в среду 4,88 нмоль/мл пептида HA-1. Экспериментальные образцы, где эффекторами выступали подвергшиеся мок-трансдукции CD8⁺ Т-клетки служили в качестве отрицательного контроля. Периферические мононуклеары пациентов, культивировавшиеся без добавления эффекторов, использовали

в качестве контроля фоновой гибели клеток. Графики окрашивания на каспазу 3/7 и 7AAD приведены для двух репрезентативных позитивных по HLA-A*02:01 пациентов. Б. 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 обозначает долю клеток-мишеней в экспериментальном образце, положительных по каспазам 3/7 и/или 7AAD. 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. (В) Трансгенные CD8⁺ 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. 29В), однако насыщающая концентрация антигена не приводила к полному лизису всех клеток-мишеней. По-видимому, количество антигена на поверхности клеток является лишь одним из факторов, влияющих на эффективность цитотоксического ответа. Логично было бы предположить, что большая вариативность клеточной гибели между образцами разных пациентов может объясняться разным количеством опухолевых клеток в образцах, поскольку опухолевые клетки более устойчивы к апоптозу [190]. Действительно, наблюдалась статистически значимая (p=0.0264) негативная корреляция между процентом опухолевых клеток в образцах периферической крови пациентов, измеренным при госпитализации, и эффективностью цитотоксического ответа на эти образцы (рис. 30). Однако при добавлении экзогенного пептида HA-1 негативная корреляция переставала быть статистически значимой (p=0.0565). По-видимому, различный процент опухолевых клеток в экспериментальных образцах оказывает влияние на цитотоксический ответ Т-клеток, и меньшее количество эндогенного пептида HA-1 на опухолевых клетках – наиболее вероятное объяснение наблюдаемого тренда, и эта гипотеза согласуется с данными экспрессии *ARHGAP45* (рис.1 приложения).

Важно также отметить, что первичные CD8⁺ 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^{+/+} и 8 из 14 пациентов с генотипом HA-1^{+/-}, процент активированных репортерных лимфоцитов был неотличим от процента активации в негативных контролях. В то же время, при исследовании цитотоксического ответа трансгенных CD8⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенный ТКР ER28, не наблюдали значительной гибели только клеток трех HA-1-позитивных пациентов.

Большинство образцов крови принадлежало пациентам с ОМЛ (таблица 5 приложения), 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, позволяет рассматривать МАГ HA-1 как потенциальную универсальную иммуногенную мишень для иммунотерапии различных злокачественных гематологических новообразований.

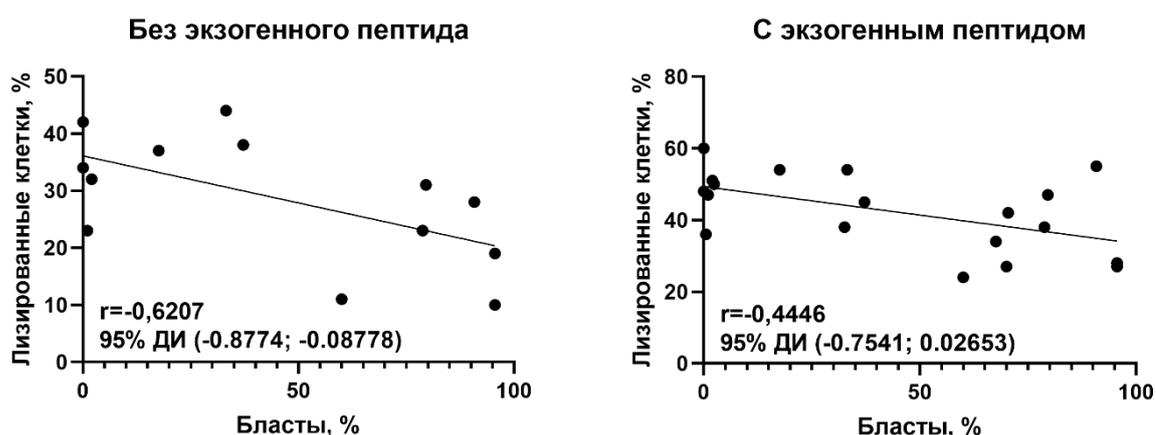


Рисунок 30. Цитотоксический эффект трансгенных HA-1-специфичных Т-клеток негативно коррелирует с процентным содержанием бластов в образцах периферической крови, однако при добавлении экзогенного пептида этот тренд теряет статистическую значимость. Коэффициент корреляции Спирмена был рассчитан для ненормального распределения данных, уровень статистической значимости $\alpha=0.05$. Каждая точка соответствует проценту гибели клеток-мишеней, как показано на рис.29, и проценту бластов в каждом образце. На графике «без экзогенного пептида» исследованы клетки всех позитивных по HA-1 пациентов, на графике «с экзогенным пептидом» исследованы клетки

всех позитивных по HLA-A*02:01 пациентов. Корреляцию рассчитывали для цитотоксических экспериментов, как с добавлением экзогенного пептида, так и без (данные из таблицы 5 приложения). В экспериментах без добавления экзогенного пептида корреляция была определена как значимая: коэффициент корреляции $r=-0.6207$, доверительный интервал (ДИ): -0.8774 ; -0.08778 , двустороннее p -значение= 0.0264 . В экспериментах с добавлением экзогенного пептида статистическая значимость корреляции не была показана: коэффициент корреляции $r=-0.4446$, ДИ: -0.7541 ; 0.02653), двустороннее p -значение= 0.0565 .

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Среди всех типов Т-клеточной иммунотерапии в настоящее время доминируют Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) – это очевидно по огромному количеству (более 600) активных клинических испытаний [154], а также по большому разнообразию (более 80) потенциальных мишеней, на которые разрабатывается терапия [95]. По сравнению с CAR-T, терапия с применением трансгенных ТКР все еще находится в зачаточном состоянии: проводятся около 100 клинических испытаний и определены 19 антигенов [156,157]. Это несоответствие можно объяснить большей технической сложностью модификации клеток конструктором с трансгенным ТКР, состоящим из двух белковых цепей, в отличие от одной белковой цепи у CAR, а также сложностью идентификации Т-клеточных антигенов, требующей трудоемкого *ex vivo* культивирования Т-клеток, их экспансии и последующего анализа репертуара ТКР [191]. Однако для ряда диагнозов терапевтическое применение CAR-T ограничено из-за отсутствия подходящих поверхностных антигенов. В частности, при лечении ОМЛ, миелотоксичность, вызванная CAR-T терапией, ограничивает роль CAR-T бридж-терапией перед алло-ТГСК [11]; поэтому необходимы другие терапевтические подходы [192].

Еще одна область, в которой ТКР-Т терапия имеет некоторые преимущества перед CAR-T, — это лечение солидных опухолей [193]. Факторами, осложняющими применение Т-клеточной терапии при солидных опухолях, являются плохая инфильтрация лимфоцитов в опухоль, иммуносупрессивное микроокружение и большая по сравнению с гематологическими заболеваниями гетерогенность опухолевых клеток и их

антигенов [194]. Многие поверхностные антигены не являются необходимыми для выживания раковой клетки, поэтому их экспрессия может быть легко утрачена; или же целевые антигены экспрессируются на низком уровне; кроме того, большинство антигенов, доступных для CAR-T, представляют собой ОАА, что значительно увеличивает вероятность цитотоксического ответа на здоровые клетки [195]. Основанная на ТКР терапия имеет преимущество, поскольку использует другой класс антигенов: если CAR распознает исключительно поверхностные молекулы, ТКР способен распознавать антигены из белков, не экспрессирующихся на поверхности и потому недоступных для распознавания CAR [196]. Таким образом, уникальный для пациента репертуар ТКР опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов может быть использован в персонализированной терапии лимфоцитами с трансгенным ТКР [197].

Как показано в недавнем исследовании, специфичные к поверхностному белку клаудину CAR-T-клетки могут быть эффективно стимулированы мРНК-вакциной, индуцирующей экспрессию CLDN6 на поверхности дендритных клеток [198]. Та же стратегия может быть применена с большей эффективностью при терапии с использованием трансгенных ТКР, поскольку распознаваемые Т-рецептором антигены значительно меньшего размера и могут быть доставлены с помощью пептидной, мРНК или вирусной онколитической вакцины [199].

Эффективность презентации антигена в HLA является главным фактором, который следует учитывать при разработке эффективной ТКР-терапии. Двумя другими факторами, влияющими на эффект ТКР-терапии, являются иммуногенность пептида и различия в экспрессии источника антигена между здоровыми и опухолевыми клетками. Это значительно ограничивает выбор антигенов: в большинстве ТКР-терапий используются мишени NY-ESO-1 и WT-1 против солидных и гематологических злокачественных новообразований соответственно [157]. При этом, среди Т-клеточных ОАА высокая иммуногенность NY-ESO-1 является скорее

исключением [200]. Опухолевые неоантигены, напротив, более иммуногенны; однако лишь некоторые из них являются общими для большого числа пациентов [201]. Следовательно, поиск новых и более иммуногенных пептидов, полученных из ОАА, а также увеличение аффинности ТКР [202] необходимы для дальнейшего развития ТКР-Т терапии.

МАГ могут быть использованы как мишени для иммунотерапии наиболее выгодно в первую очередь в контексте алло-ТГСК, по сравнению с ОАА и опухолевыми неоантигенами. МАГ более иммуногенны, чем ОАА, потому что они полностью чужды для иммунной системы МАГ-негативного донора [203]. Кроме того, МАГ, экспрессия которых ограничена клетками крови, являются более безопасными мишенями по сравнению с ОАА, поскольку их представленность в таком случае будет ограничена только клетками крови реципиента [204]. При этом МАГ не являются уникальными для каждого пациента, в отличие от большинства опухолевых неоантигенов. Мишени МАГ-специфичной терапии могут быть идентифицированы без трудозатратного секвенирования транскриптома и генома опухоли [205]. Кроме того, если МАГ возникают из полиморфизма в гене, функция которого важна для злокачественной клетки, опухоль с меньшей вероятностью сможет избежать иммунного ответа путем утраты экспрессии этого гена. Уход от иммунного надзора в таком случае скорее будет осуществляться потерей генов HLA [206]. Это особенно важно при лечении ОМЛ, так как считается, что этот тип лейкоза состоит из большого количества субклонов, и нацеливание на зародышевый полиморфизм, такой как МАГ, может быть подходящей стратегией [206]. Таким образом, адаптивный перенос Т-клеток, модифицированных трансгенными ТКР - перспективный метод иммунотерапии, дополняющий алло-ТГСК для эффективной профилактики рецидивов, и может быть применен в лечении широкого спектра злокачественных новообразований крови [122,207].

В настоящее время МАГ-специфичные трансгенные Т-клетки исследуются лишь в нескольких клинических испытаниях для терапии

рецидивирующих и рефрактерных гематологических заболеваний, в особенности ОМЛ [148]. Учитывая частоту аллелей HLA и МАГ, можно предположить, что разработка терапий, направленных на 50 различных МАГ, позволит эффективно применять посттрансплантационную МАГ-специфичную терапию в 35% всех аллоТГСК [88].

Метод получения антиген-специфичных ТКР из Т-клеточных экспансий, описанный в нашей работе, может быть эффективно применен для получения репертуаров ТКР, специфичных к другим терапевтически перспективным МАГ, например НА-2 [208] и АСС-1У [128], а также любому другому Т-клеточному антигену. В нашей работе проведено сравнение полученного нами репертуара ТКР с опубликованными ранее репертуарами ТКР, специфичных к различным антигенам [148,151]. Репертуары МАГ-специфичных ТКР отличаются от опубликованных ранее и лучше изученных репертуаров вирус-специфичных ТКР, например распознающих антигены SARS-CoV2 и цитомегаловируса. Репертуар НА-1-специфичных ТКР продемонстрировал низкую степень гомологии последовательностей CDR3 и низкое разнообразие β -субъединиц V-генов, причем наиболее часто использовался ген *TRBV7-9*. Хотя анализ антигенспецифичного репертуара ТКР носит в основном описательный характер, он может быть полезен для разработки Т-клеточной терапии: некоторые V-гены являются «слабыми» из-за менее эффективного фолдинга, что снижает способность трансгенных ТКР выходить на поверхность клетки и конкурировать с эндогенным ТКР за связывание с комплексом CD3 [209]. Следовательно, знание репертуара ТКР может позволить отобрать ТКР с «сильными» генами TRAV и TRBV, обеспечивающими большее присутствие ТКР на поверхности лимфоцитов.

Эффективность экспрессии трансгенного ТКР и его выход на поверхность может быть улучшена не только выбором оптимального V-гена, но и за счет использования регионов TRAC и TRBC мышинового происхождения [160,168]. Такой подход неизбежно вызывает опасения по поводу безопасности и иммуногенности Т-клеточного продукта, поскольку

чужеродные фрагменты ТКР могут вызывать иммунный ответ [210]. Действительно, клинические испытания Т-клеток с трансгенным муринизированным ТКР показали наличие антител, специфичных к мышиному ТКР после инфузии аутологичного клеточного продукта примерно у 23% пациентов [170]. Однако обнаруженные антитела были нейтрализующими и могли влиять на эффективность терапии только в половине из этих случаев. Что еще более важно, образовавшиеся после адоптивного переноса антитела были специфичны к вариабельным доменам муринизированного ТКР, расположенным более дистально относительно клеточной мембраны, и потому более доступным для распознавания иммунной системой. В использованных нами ТКР, мышинное происхождение имеют только регионы TRAC и TRBC, что снижает иммуногенность трансгенных ТКР. Однако сохраняется возможность развития CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа реципиента на пептиды, происходящие из чужеродных частей генетического конструктора [211]. Хотя мало что известно об ответе Т-киллеров, направленном на муринизированные ТКР, есть свидетельства того, что ответ на CD8⁺ Т-клеток на CAR-T снижает эффективность терапии [212,213]. Следовательно, для терапевтического применения может потребоваться устранение Т-клеточных иммуногенных эпитопов мышинового ТКР, что может быть направлением для дальнейшей работы.

Модификация трансгенным ТКР может привести к гетеродимеризации между α и β субъединицами трансгенного и эндогенного ТКР, способствуя образованию нового потенциально кроссреактивного ТКР [159]. Предотвратить это может CRISPR/Cas нокаут эндогенного ТКР [214,215] и замена человеческих константных цепей трансгенного ТКР на мышинные, способствуя преимущественной гибридизации трансгенных субъединиц ТКР между собой. Генетическая модификация клеток путем электропорации RNP комплексами, согласно литературным данным, более безопасна по сравнению с доставкой CRISPR/Cas лентивирусным вектором. Так, при электропорации

белок Cas9 не вызывал иммунного ответа из-за кратковременного присутствия в организме, в отличие от конститутивной экспрессии с интегрированного в геном вирусного вектора. Показано, что при кратковременном воздействии нецелевая активность Cas9 незначительна и не может повлиять на генетическую стабильность Т-клеточного терапевтического продукта [216]. По мере того, как белок Cas9 и системы электропорации клинического уровня становятся все более доступными, CRISPR/Cas нокаут эндогенного ТКР вероятно станет стандартной процедурой при производстве терапевтического Т-клеточного продукта.

Персистенция модифицированных Т-клеток критична для эффективности терапии [196]. CAR-T-клетки с костимуляторным доменом 4-1BB демонстрируют лучшую персистенцию, чем CAR-T с доменом CD28, что связано с более умеренным уровнем активации рецепторов и как следствие меньшим истощением клеток [217]. Трансгенный ТКР индуцирует наиболее физиологичный уровень активации лимфоцитов по сравнению с CAR, и прямое сравнение CAR-T и ТКР-T показало, что, хотя CAR-T являются более мощными эффекторами в короткой перспективе, клетки ТКР-T более эффективны при высокой опухолевой нагрузке, поскольку меньше истощаются и более эффективно пролиферируют по сравнению с CAR-T [218]. Персистенция *in vivo* клеток с трансгенным ТКР, прошедших *ex vivo* экспансию и адоптивный перенос, может варьировать от недели [219] до более чем 430 дней [220]. В среднем, персистенция лимфоцитов с трансгенным ТКР длится как минимум 2-6 месяцев [221-223]. Использование высоких доз IL-2 во время культивирования *ex vivo* способствует преимущественному фенотипу эффекторной памяти в лимфоцитах, что отрицательно влияет на персистенцию лимфоцитов и эффективность терапии, что было явно продемонстрировано на трансфузии HA-1-специфичных Т-клеточных экспансий [140]. Персистенцию лимфоцитов с трансгенным ТКР можно увеличить, если модифицировать популяции наивных клеток и стволовых клеток памяти, что доказало свою эффективность при производстве CAR-T

[224]. В ряде случаев персистенция CAR-T достигала 10 лет после инфузии, и от клеток с трансгенным ТКР можно ожидать не меньшей длительности персистенции [225].

С помощью передовых методов генной инженерии и биоинформатических инструментов для прогнозирования иммуногенности пептидов, терапия на основе лимфоцитов с трансгенным ТКР имеет возможность стать высокоэффективным и специфичным методом лечения, когда другие подходы показывают недостаточную эффективность, что особенно актуально для терапии рецидивирующего и рефрактерного ОМЛ. При этом именно МАГ – наиболее многообещающие мишени для посттрансплантационной терапии злокачественных новообразований крови, поскольку в отличие от других классов антигенов, МАГ позволяют Т-лимфоцитам эффективно различать клетки крови донорского и реципиентского происхождения.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами были получены трансгенные CD8⁺ Т-лимфоциты, распознающие минорные антигены гистосовместимости АСС-1У и НА-1, подтверждена функциональная активность трансгенных CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к МАГ АСС-1У и НА-1.

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

1. Стимуляция наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов здоровых доноров *in vitro* позволяет получить культуры Т-клеток, распознающих минорные антигены НА-1 и АСС-1У. Антиген-специфичные α и β 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⁺ Т-лимфоциты с нокаутом эндогенного ТКР методом CRISPR/Cas, несущие трансгенный HA-1-специфичный ТКР ER28, специфично уничтожают *in vitro* клетки периферической крови пациентов с минорным антигеном HA-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 HA-1-специфичных лимфоцитов *in vivo* на мышинной модели.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность научному руководителю Ефимову Григорию Александровичу за руководство во время выполнения данной работы и моему куратору от МГУ, Купрашу Дмитрию Владимировичу, за консультацию на всех этапах работы, а также неоценимую помощь в подготовке текста диссертации. Выражаю признательность Аполлинару Боголюбовой-Кузнецовой за помощь в публикации работы и организации предзащиты. Благодарю ученого секретаря кафедры иммунологии Киселевского Дмитрия Борисовича за ценные замечания по оформлению диссертации и автореферата.

Искренне благодарю Романюка Дмитрия Сергеевича за менторство и помощь в постановке и интерпретации экспериментов. Выражаю большую признательность Анне Габашвили за её большой экспериментальный труд на последнем этапе работы. Благодарю Антона Шмелева и Дмитрия Дианова за их вклад в разработку генетических конструкторов и выведении клеточных линий. Выражаю благодарность Мураду Вагида за помощь в дизайне цитометрических экспериментов. Выражаю благодарность Александре Хмелевской за биоинформатическую обработку данных, а также Савелию Шитикову и Зорниковой Ксении за предоставление клеточных экспансий для

анализа. Благодарю Баракову Динару за своевременную доставку реактивов и административную помощь в подготовке к защите диссертации.

Также благодарю Недоспасова Сергея Артуровича за помощь в организации защиты, а также весь преподавательский коллектив кафедры иммунологии за обучение и научный интерес к иммунологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савченко ВГ, Любимова ЛС, Паровичникова ЕН, Менделеева и др. Трансплантации аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-летнего опыта). // Терапевтический архив. 2007. Vol. 79, № 7. P. 30–35.
2. Giebel S. et al. Comparable results of autologous and allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for adults with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia in first complete molecular remission: An analysis by the Acute Leukemia Working Party of the EBMT // Eur J Cancer. 2018. Vol. 96. P. 73–81.
3. Schmid C. et al. Outcome after relapse of myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia following allogeneic stem cell transplantation: a retrospective registry analysis on 698 patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation // Haematologica. 2018. Vol. 103, № 2. P. 237–245.
4. Rautenberg C. et al. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment // Int J Mol Sci. 2019. Vol. 20, № 1. P. 228.
5. Schmid C. et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation // Blood. 2012. Vol. 119, № 6. P. 1599–1606.
6. McDonald G.B. et al. Survival, Nonrelapse Mortality, and Relapse-Related Mortality After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Comparing 2003–2007 Versus 2013–2017 Cohorts // Ann Intern Med. 2020. Vol. 172, № 4. P. 229.
7. Kröger N. The EBMT Handbook, Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. 2018. P. 437–442.
8. Kirtonia A. et al. A comprehensive review of genetic alterations and molecular targeted therapies for the implementation of personalized medicine in acute myeloid leukemia // J Mol Med. 2020. Vol. 98, № 8. P. 1069–1091.
9. Савченко, В. Г., Менделеева, Л. П., Паровичникова, и др. (2015). Способ лечения рецидива острого миелоидного лейкоза после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Патент № RU 2538799 С1, 2019.

10. Zhang X. et al. Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features // *Blood Adv.* 2020. Vol. 4, № 10. P. 2325–2338.
11. Mardiana S., Gill S. CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions // *Frontiers Oncol.* 2020. Vol. 10. P. 697.
12. Korngold R., Sprent J. Features of T cells causing H-2-restricted lethal graft-vs.-host disease across minor histocompatibility barriers. // *J Exp Medicine.* 1982. Vol. 155, № 3. P. 872–883.
13. Korngold R., Sprent J. Lethal GVHD Across Minor Histocompatibility Barriers: Nature of the Effector Cells and Role of the H-2 Complex // *Immunol Rev.* 1983. Vol. 71, № 1. P. 5–30.
14. Goulmy E. et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. // *New Engl J Medicine.* 1996. Vol. 334, № 5. P. 281–285.
15. Butturini A., Bortin M.M., Gale R.P. Graft-versus-leukemia following bone marrow transplantation. // *Bone Marrow Transpl.* 1987. Vol. 2, № 3. P. 233–242.
16. Weiden P.L. et al. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts // *New Engl J Medicine.* 1979. Vol. 300, № 19. P. 1068–1073.
17. Jones R. et al. Evidence of a graft-versus-lymphoma effect associated with allogeneic bone marrow transplantation. // *Blood.* 1991. Vol. 77, № 3. P. 649–653.
18. Thomas E.D. A history of haemopoietic cell transplantation // *Brit J Haematol.* 1999. Vol. 105, № 2. P. 330–339.
19. Slavin R.E., Woodruff J.M. The pathology of bone marrow transplantation. // *Pathol Annu.* 1974. Vol. 9, № 0. P. 291–344.
20. Ефимов Г. А. и др. Иммунобиология острой реакции «трансплантат против хозяина» // *Медицинская иммунология.* – 2015. – Т. 17. – №. 6. – С. 499-516.
21. Lakkis F.G., Lechler R.I. Origin and Biology of the Allogeneic Response // *Csh Perspect Med.* 2013. Vol. 3, № 8. P. a014993.
22. D’Orsogna L. et al. Endogenous-peptide-dependent alloreactivity: new scientific insights and clinical implications // *Tissue Antigens.* 2013. Vol. 81, № 6. P. 399–407.
23. Bleakley M. et al. Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8+ T cells. // *Blood.* 2010. Vol. 115, № 23. P. 4923–4933.
24. Weiden P.L. et al. Antileukemic Effect of Chronic Graft-versus-Host Disease: Contribution to Improved Survival after Allogeneic Marrow Transplantation // *New Engl J Med.* 1981. Vol. 304, № 25. P. 1529–1533.
25. Horowitz M.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. // *Blood.* 1990. Vol. 75, № 3. P. 555–562.

26. Inamoto Y. et al. Influence of immunosuppressive treatment on risk of recurrent malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. // *Blood*. 2011. Vol. 118, № 2. P. 456–463.
27. Kersey J.H. et al. Comparison of Autologous and Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Treatment of High-Risk Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia // *New Engl J Med*. 1987. Vol. 317, № 8. P. 461–467.
28. Gratwohl A. et al. Alloreactivity: the Janus-face of hematopoietic stem cell transplantation // *Leukemia*. 2017. Vol. 31, № 8. P. 1752–1759.
29. Falkenburg J.H.F. et al. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions // *Curr Opin Hematol*. 2002. Vol. 9, № 6. P. 497–502.
30. Wilke M. et al. Quantification of the HA-1 gene product at the RNA level; relevance for immunotherapy of hematological malignancies // *The Hematology Journal*. 2003. Vol. 4, № 5. P. 315–320.
31. Nagy B. et al. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma // *Brit J Haematol*. 2003. Vol. 120, № 3. P. 434–441.
32. Bevan M.J. The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. // *J Exp Medicine*. 1975. Vol. 142, № 6. P. 1349–1364.
33. Korngold R., Sprent J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. // *J Exp Medicine*. 1978. Vol. 148, № 6. P. 1687–1698.
34. Hamilton B.L., Bevan M.J., Parkman R. Anti-recipient cytotoxic T lymphocyte precursors are present in the spleens of mice with acute graft versus host disease due to minor histocompatibility antigens. // *J Immunol Baltim Md 1950*. 1981. Vol. 126, № 2. P. 621–625.
35. Bjorkman P. et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens // *Nature*. 1987. Vol. 329, № 6139. P. 512–518.
36. Wallny H.-J., Rammensee H.-G. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide // *Nature*. 1990. Vol. 343, № 6255. P. 343275a0.
37. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy // *Immunol Rev*. 1997. Vol. 157, № 1. P. 125–140.
38. Kernan N.A. et al. Analysis of 462 Transplantations from Unrelated Donors Facilitated by the National Marrow Donor Program // *New Engl J Med*. 1993. Vol. 328, № 9. P. 593–602.
39. Kernan N.A., Dupont B. Minor Histocompatibility Antigens and Marrow Transplantation // *New Engl J Med*. 1996. Vol. 334, № 5. P. 323–324.
40. Haan J.M.M. den et al. The Minor Histocompatibility Antigen HA-1: A Diallelic Gene with a Single Amino Acid Polymorphism // *Science*. 1998. Vol. 279, № 5353. P. 1054–1057.

41. Boehmer H. von, Hafen K. Minor but not major histocompatibility antigens of thymus epithelium tolerize precursors of cytolytic T cells // *Nature*. 1986. Vol. 320, № 6063. P. 626–628.
42. Vincent K., Roy D.-C., Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy // *Blood*. 2011. Vol. 118, № 11. P. 2951–2959.
43. Goulmy E. et al. A minor transplantation antigen detected by MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes during graft-versus-host disease // *Nature*. 1983. Vol. 302, № 5904. P. 159–161.
44. Rötzschke O. et al. Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. // *Science (New York, N.Y.)*. 1990. Vol. 249, № 4966. P. 283–287.
45. Els C. van et al. Immunogenetics of human minor histocompatibility antigens: their polymorphism and immunodominance. // *Immunogenetics*. 1992. Vol. 35, № 3. P. 161–165.
46. Rufer N. et al. HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation // *Transplantation*. 1998. Vol. 66, № 7. P. 910–916.
47. Korngold R. et al. Inter-strain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. // *Biology Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 1997. Vol. 3, № 2. P. 57–64.
48. Pion S. et al. Immunodominant minor histocompatibility antigens expressed by mouse leukemic cells can serve as effective targets for T cell immunotherapy. // *J Clin Invest*. 1995. Vol. 95, № 4. P. 1561–1568.
49. Yewdell J.W., Bennink J.R. immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses // *Annu Rev Immunol*. 1999. Vol. 17, № 1. P. 51–88.
50. Wettstein P.J. Immunodominance in the T-Cell response to multiple non-H-2 histocompatibility antigens // *Immunogenetics*. 1986. Vol. 24, № 1. P. 24–31.
51. Chen W. et al. Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. // *J Exp Medicine*. 1994. Vol. 180, № 4. P. 1471–1483.
52. Pion S. et al. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens // *Eur J Immunol*. 1997. Vol. 27, № 2. P. 421–430.
53. Mori S., El-Baki H., Mullen C. Analysis of immunodominance among minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplantation*. 2003. Vol. 31, № 10. P. 865–875.
54. Hobo W. et al. Association of Disparities in Known Minor Histocompatibility Antigens with Relapse-Free Survival and Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation // *Biol Blood Marrow Tr*. 2013. Vol. 19, № 2. P. 274–282.
55. Korngold R., Wettstein P.J. Immunodominance in the graft-vs-host disease T cell response to minor histocompatibility antigens. // *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990. Vol. 145, № 12. P. 4079–4088.

56. Goulmy E. et al. Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA // *Nature*. 1977. Vol. 266, № 5602. P. 544–545.
57. Antón L.C., Yewdell J.W. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors // *Journal of Leukocyte Biology*. 2014. Vol. 95, № 4. P. 551–562.
58. Apcher S. et al. Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway // *Proc National Acad Sci*. 2013. Vol. 110, № 44. P. 17951–17956.
59. Granados D. et al. MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements // *Blood*. 2012. Vol. 119, № 26. P. e181–e191.
60. Laumont C.M. et al. Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames // *Nature Communications*. 2016. Vol. 7. P. 10238.
61. Hanna J. et al. Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease // *Am J Pathology*. 2018. Vol. 189, № 1. P. 94–103.
62. Kisselev A.F. et al. The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation* // *J Biol Chem*. 1999. Vol. 274, № 6. P. 3363–3371.
63. Pearson H. et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome // *Journal of Clinical Investigation*. 2016. Vol. 126, № 12. P. 4690–4701.
64. Abele R., Tampé R. Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition // *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Biomembr*. 1999. Vol. 1461, № 2. P. 405–419.
65. Rock K.L., Goldberg A.L. degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides // *Annu Rev Immunol*. 1999. Vol. 17, № 1. P. 739–779.
66. Bykova N.A., Malko D.B., Efimov G.A. In Silico Analysis of the Minor Histocompatibility Antigen Landscape Based on the 1000 Genomes Project // *Front Immunol*. 2018. Vol. 9. P. 1819.
67. Spierings E. et al. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis (Lbc) oncoprotein // *Blood*. 2003. Vol. 102, № 2. P. 621–629.
68. Brickner A.G. et al. The Immunogenicity of a New Human Minor Histocompatibility Antigen Results from Differential Antigen Processing // *J Exp Medicine*. 2001. Vol. 193, № 2. P. 195–206.
69. Spierings E. et al. Steric hindrance and fast dissociation explain the lack of immunogenicity of the minor histocompatibility HA-1Arg Null allele. // *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009. Vol. 182, № 8. P. 4809–4816.
70. Пилунов А. et al. Минорные антигены гистосовместимости как мишени Т-клеточной иммунотерапии | Пилунов | Гематология и трансфузиология [Electronic resource]. URL: <https://www.htjournal.ru/jour/article/view/295/217> (accessed: 25.10.2021).

71. Rijke B. de et al. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia // *J Clin Invest*. 2005. Vol. 115, № 12. P. 3506–3516.
72. Brickner A.G. et al. The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL. // *Blood*. 2006. Vol. 107, № 9. P. 3779–3786.
73. Broen K. et al. A Polymorphism in the Splice Donor Site of ZNF419 Results in the Novel Renal Cell Carcinoma-Associated Minor Histocompatibility Antigen ZAPHIR // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 6. P. e21699.
74. Kawase T. et al. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen // *Blood*. 2007. Vol. 110, № 3. P. 1055–1063.
75. Terakura S. et al. A Single Minor Histocompatibility Antigen Encoded by UGT2B17 and Presented by Human Leukocyte Antigen-A*2902 and -B*4403 // *Transplantation*. 2007. Vol. 83, № 9. P. 1242–1248.
76. Griffioen M., Bergen C.A. van, Falkenburg J. Autosomal Minor Histocompatibility Antigens: How Genetic Variants Create Diversity in Immune Targets. // *Frontiers in immunology*. 2016. Vol. 7. P. 100.
77. Meadows L. et al. The HLA-A*0201-restricted H-Y antigen contains a posttranslationally modified cysteine that significantly affects T cell recognition. // *Immunity*. 1997. Vol. 6, № 3. P. 273–281.
78. Granados D.P. et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. // *Nature communications*. 2014. Vol. 5. P. 3600.
79. Bijen H.M. et al. Specific T Cell Responses against Minor Histocompatibility Antigens Cannot Generally Be Explained by Absence of Their Allelic Counterparts on the Cell Surface. // *Proteomics*. 2017. Vol. 18, № 12. P. 1700250.
80. Balen P. van et al. CD4 Donor Lymphocyte Infusion Can Cause Conversion of Chimerism Without GVHD by Inducing Immune Responses Targeting Minor Histocompatibility Antigens in HLA Class II. // *Frontiers in immunology*. 2018. Vol. 9. P. 3016.
81. Christopher M.J. et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation // *New Engl J Med*. 2018. Vol. 379, № 24. P. 2330–2341.
82. Toffalori C. et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation // *Nature Medicine*. 2019. Vol. 25, № 4. P. 603–611.
83. Brooks A.G., Boyington J.C., Sun P.D. Natural killer cell recognition of HLA class I molecules. // *Rev Immunogenetics*. 2000. Vol. 2, № 3. P. 433–448.
84. Fuchs K.J. et al. Optimized Whole Genome Association Scanning for Discovery of HLA Class I-Restricted Minor Histocompatibility Antigens // *Front Immunol*. 2020. Vol. 11. P. 659.
85. Martin P.J. et al. Genome-wide minor histocompatibility matching as related to the risk of graft-versus-host disease. // *Blood*. 2016. Vol. 129, № 6. P. 791–798.

86. Roy D.C., Perreault C. Major vs minor histocompatibility antigens. // *Blood*. 2017. Vol. 129, № 6. P. 664–666.
87. Hombrink P. et al. High-Throughput Identification of Potential Minor Histocompatibility Antigens by MHC Tetramer-Based Screening: Feasibility and Limitations // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 8. P. e22523.
88. Oostvogels R., Lokhorst H., Mutis T. Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives // *Bone Marrow Transplantation*. 2015. Vol. 51, № 2. P. 163–171.
89. Bleakley M., Riddell S.R. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia // *Immunology and Cell Biology*. 2011. Vol. 89, № 3. P. 396–407.
90. Bergen C.A. van et al. Selective graft-versus-leukemia depends on magnitude and diversity of the alloreactive T cell response. // *The Journal of clinical investigation*. 2017. Vol. 127, № 2. P. 517–529.
91. Granados D. et al. Proteogenomic-based discovery of minor histocompatibility antigens with suitable features for immunotherapy of hematologic cancers // *Leukemia*. 2016. Vol. 30, № 6. P. 1344.
92. Summers C., Sheth V.S., Bleakley M. Minor Histocompatibility Antigen-Specific T Cells // *Frontiers Pediatrics*. 2020. Vol. 8. P. 284.
93. Chalmers Z.R. et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden // *Genome Med*. 2017. Vol. 9, № 1. P. 34.
94. Romaniuk D.S. et al. Rapid Multiplex Genotyping of 20 HLA-A*02:01 Restricted Minor Histocompatibility Antigens // *Frontiers in Immunology*. 2019. Vol. 10. P. 1226.
95. MacKay M. et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors // *Nat Biotechnol*. 2020. Vol. 38, № 2. P. 233–244.
96. Wudhikarn K. et al. Infection during the first year in patients treated with CD19 CAR T cells for diffuse large B cell lymphoma // *Blood Cancer J*. 2020. Vol. 10, № 8. P. 79.
97. Vago L. et al. Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation // *The New England Journal of Medicine*. 2009. Vol. 361, № 5. P. 478–488.
98. Nicholls S. et al. Secondary anchor polymorphism in the HA-1 minor histocompatibility antigen critically affects MHC stability and TCR recognition. // *P Natl Acad Sci Usa*. 2009. Vol. 106, № 10. P. 3889–3894.
99. Mutis T. et al. Tetrameric HLA class I–minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease // *Nature Medicine*. 1999. Vol. 5, № 7. P. 839–842.
100. Tseng L.-H. et al. Correlation Between Disparity for the Minor Histocompatibility Antigen HA-1 and the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Marrow Transplantation // *Blood*. 1999. Vol. 94, № 8. P. 2911–2914.

101. Socié G. et al. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Transplantation*. 2001. Vol. 72, № 4. P. 699–706.
102. Gallardo D. et al. Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation // *British Journal of Haematology*. 2001. Vol. 114, № 4. P. 931–936.
103. Murata M. et al. No significant association between HA-1 incompatibility and incidence of acute graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in Japanese patients. // *Int J Hematol*. 2000. Vol. 72, № 3. P. 371–375.
104. Heinemann F.M. et al. Impact of disparity of minor histocompatibility antigens ha-1, cd31, and cd49b in hematopoietic stem cell transplantation of patients with chronic myeloid leukemia with sibling and unrelated donors // *Transplantation*. 2004. Vol. 77, № 7. P. 1103–1106.
105. Lin M. et al. Absence of statistically significant correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen-HA-1 and outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. // *Blood*. 2001. Vol. 98, № 10. P. 3172–3173.
106. Spellman S. et al. Effects of mismatching for minor histocompatibility antigens on clinical outcomes in HLA-matched, unrelated hematopoietic stem cell transplants. // *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009. Vol. 15, № 7. P. 856–863.
107. Marijt W.A.E. et al. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. // *P Natl Acad Sci Usa*. 2003. Vol. 100, № 5. P. 2742–2747.
108. Fujii N. et al. Expression of minor histocompatibility antigen, HA-1, in solid tumor cells // *Transplantation*. 2002. Vol. 73, № 7. P. 1137–1141.
109. Bueger M. de et al. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. // *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992. Vol. 149, № 5. P. 1788–1794.
110. Dickinson A.M. et al. In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens // *Nature Medicine*. 2002. Vol. 8, № 4. P. 410–414.
111. Teshima T. et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium // *Nature Medicine*. 2002. Vol. 8, № 6. P. 575–581.
112. Matte-Martone C. et al. CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL // *Blood*. 2008. Vol. 111, № 7. P. 3884–3892.
113. Miller J.S. et al. NCI First International Workshop on The Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from

the Committee on the Biology Underlying Recurrence of Malignant Disease following Allogeneic HSCT: Graft-versus-Tumor/Leukemia Reaction // *Biol Blood Marrow Tr.* 2010. Vol. 16, № 5. P. 565–586.

114. Mapara M.Y. et al. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells // *Blood.* 2002. Vol. 100, № 5. P. 1903–1909.

115. Barge R.M.Y. et al. Minimal GVHD following in-vitro Tcell-depleted allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning allowing subsequent infusions of donor lymphocytes in patients with hematological malignancies and solid tumors // *Exp Hematol.* 2003. Vol. 31, № 10. P. 865–872.

116. Kolb H.-J.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. // *Blood.* 2008. Vol. 112, № 12. P. 4371–4383.

117. Johnson B., Truitt R. Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. // *Blood.* 1995. Vol. 85, № 11. P. 3302–3312.

118. Epstein F.H., Ferrara J.L.M., Deeg H.J. Graft-versus-Host Disease // *New Engl J Medicine.* 1991. Vol. 324, № 10. P. 667–674.

119. Haan J.M.M. den et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. // *Sci New York N Y.* 1995. Vol. 268, № 5216. P. 1476–1480.

120. Pierce R.A. et al. The HA-2 Minor Histocompatibility Antigen Is Derived from a Diallelic Gene Encoding a Novel Human Class I Myosin Protein // *The Journal of Immunology.* 2001. Vol. 167, № 6. P. 3223–3230.

121. Spierings E. et al. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. // *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2013. Vol. 19, № 8. P. 1244–1253.

122. Heemskerk M., of ... H.M. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. 2004.

123. Bijen H.M. et al. Preclinical strategies to identify off-target toxicity of high-affinity TCRs // *Molecular Therapy.* 2018. Vol. 26, № 5. P. 1206–1214.

124. Lio H.-Y. et al. Minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 polymorphisms in Taiwan: frequency and application in hematopoietic stem cell transplantation // *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2010. Vol. 48, № 9. P. 1287–1293.

125. Sellami M.H. et al. HA-1 and HA-2 minor histocompatibility antigens in Tunisians // *Tissue Antigens.* 2010. Vol. 75, № 6. P. 720–723.

126. Akatsuka Y. et al. Identification of a Polymorphic Gene, BCL2A1, Encoding Two Novel Hematopoietic Lineage-specific Minor Histocompatibility Antigens // *The Journal of Experimental Medicine.* 2003. Vol. 197, № 11. P. 1489–1500.

127. Sochalska M. et al. MYC selects against reduced BCL2A1/A1 protein expression during B cell lymphomagenesis // *Oncogene*. 2017. Vol. 36, № 15. P. 2066–2073.
128. Pilunov A. et al. Modification of Cytotoxic Lymphocytes with T Cell Receptor Specific for Minor Histocompatibility Antigen ACC-1Y // *Molecular Biology*. 2019. Vol. 53, № 3. P. 402–410.
129. Spierings E. et al. A Uniform Genomic Minor Histocompatibility Antigen Typing Methodology and Database Designed to Facilitate Clinical Applications // *Plos One*. 2006. Vol. 1, № 1. P. e42.
130. Torikai H. et al. Aberrant expression of BCL2A1-restricted minor histocompatibility antigens in melanoma cells: application for allogeneic transplantation // *International Journal of Hematology*. 2008. Vol. 87, № 5. P. 467–473.
131. Kloosterboer F.M. et al. Up-regulated expression in nonhematopoietic tissues of the BCL2A1-derived minor histocompatibility antigens in response to inflammatory cytokines: relevance for allogeneic immunotherapy of leukemia // *Blood*. 2005. Vol. 106, № 12. P. 3955–3957.
132. Nishida T. et al. Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant // *Brit J Haematol*. 2004. Vol. 124, № 5. P. 629–635.
133. Akatsuka Y. et al. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen // *Brit J Haematol*. 2006. Vol. 135, № 3. P. 413–414.
134. Roback J.D. Vaccine-Enhanced Donor Lymphocyte Infusion (veDLI) // *Hematology*. 2006. Vol. 2006, № 1. P. 486–491.
135. Fontaine P. et al. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. // *Nature medicine*. 2001. Vol. 7, № 7. P. 789–794.
136. Kloosterboer F. et al. Direct cloning of leukemia-reactive T cells from patients treated with donor lymphocyte infusion shows a relative dominance of hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 specific T cells // *Leukemia*. 2004. Vol. 18, № 4. P. 798.
137. Sheetikov S. et al. In silico analysis of T-cell receptors specific to the minor histocompatibility antigen HA-2 // *Российский Иммунологический Журнал*. 2019. Vol. 22(1). P. 31–43.
138. Marijt E. et al. Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation // *Haematologica*. 2007. Vol. 92, № 1. P. 72–80.
139. Warren E.H. et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. // *Blood*. 2010. Vol. 115, № 19. P. 3869–3878.

140. Meij P. et al. Generation and administration of HA-1-specific T-cell lines for the treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation: a pilot study. // *Haematologica*. 2012. Vol. 97, № 8. P. 1205–1208.
141. Bondanza A. et al. IL-7 receptor expression identifies suicide gene–modified allospecific CD8+ T cells capable of self-renewal and differentiation into antileukemia effectors // *Blood*. 2011. Vol. 117, № 24. P. 6469–6478.
142. Waart A.B. van der et al. Inhibition of Akt signaling promotes the generation of superior tumor-reactive T cells for adoptive immunotherapy // *Blood*. 2014. Vol. 124, № 23. P. 3490–3500.
143. Franssen L. et al. A phase I/II minor histocompatibility antigen-loaded dendritic cell vaccination trial to safely improve the efficacy of donor lymphocyte infusions in myeloma // *Bone Marrow Transplantation*. 2017. Vol. 52, № 10.
144. Oostvogels R. et al. Efficacy of host-dendritic cell vaccinations with or without minor histocompatibility antigen loading, combined with donor lymphocyte infusion in multiple myeloma patients // *Bone Marrow Transplantation*. 2016. Vol. 52, № 2. P. 228–237.
145. Calmeiro J. et al. Dendritic Cell Vaccines for Cancer Immunotherapy: The Role of Human Conventional Type 1 Dendritic Cells // *Pharm*. 2020. Vol. 12, № 2. P. 158.
146. Вдовин А. С. и др. Применение рекомбинантных МНС-тетрамеров для изоляции вирусспецифичных CD8+-клеток здоровых доноров: потенциальный подход к клеточной терапии посттрансплантационной цитомегаловирусной инфекции // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81. – №. 11. – С. 1628-1642.
147. Loenen M.M. van et al. A Good Manufacturing Practice procedure to engineer donor virus-specific T cells into potent anti-leukemic effector cells // *Haematologica*. 2014. Vol. 99, № 4. P. 759–768.
148. Balen P. van et al. HA-1H T-Cell Receptor Gene Transfer to Redirect Virus-Specific T Cells for Treatment of Hematological Malignancies After Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Phase 1 Clinical Study // *Front Immunol*. 2020. Vol. 11. P. 1804.
149. Kretschmer L. et al. Differential expansion of T central memory precursor and effector subsets is regulated by division speed // *Nat Commun*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 113.
150. Gamadia L.E. et al. The Size and Phenotype of Virus-Specific T Cell Populations Is Determined by Repetitive Antigenic Stimulation and Environmental Cytokines // *The Journal of Immunology*. 2004. Vol. 172, № 10. P. 6107–6114.
151. Dossa R.G. et al. Development of T-cell immunotherapy for hematopoietic stem cell transplantation recipients at risk of leukemia relapse. // *Blood*. 2018. Vol. 131, № 1. P. 108–120.
152. Романюк Д. С. и др. Клинически значимые минорные антигены гистосовместимости для российских пациентов, получающих трансплантацию стволовых клеток крови // *Медицинская иммунология*. – 2019. – Т. 21. – №. 5. – С. 847-860.

153. Gross G., Waks T., Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. Vol. 86, № 24. P. 10024–10028.
154. Ivica N.A., Young C.M. Tracking the CAR-T Revolution: Analysis of Clinical Trials of CAR-T and TCR-T Therapies for the Treatment of Cancer (1997–2020) // *Healthc*. 2021. Vol. 9, № 8. P. 1062.
155. Cappell K.M., Kochenderfer J.N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far // *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2023. Vol. 20, № 6. P. 359–371.
156. Zhang Y., Li Y. T cell receptor-engineered T cells for leukemia immunotherapy // *Cancer Cell International*. 2019. Vol. 19, № 1. P. 2.
157. Oppermans N. et al. Transgenic T-cell receptor immunotherapy for cancer: building on clinical success // *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2020. Vol. 8. P. 2515135520933509.
158. Guzman G. et al. CAR-T Therapies in Solid Tumors: Opportunities and Challenges // *Curr. Oncol. Rep*. 2023. Vol. 25, № 5. P. 479–489.
159. Loenen M.M. van et al. Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. // *Proc National Acad Sci*. 2010. Vol. 107, № 24. P. 10972–10977.
160. Morton L.T. et al. Simultaneous Deletion of Endogenous TCR $\alpha\beta$ for TCR Gene Therapy Creates an Improved and Safe Cellular Therapeutic // *Mol Ther*. 2019.
161. Inaguma Y. et al. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H // *Gene Ther*. 2014. Vol. 21, № 6. P. 575–584.
162. Sommermeyer D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo // *Leukemia*. 2016. Vol. 30, № 2. P. 492.
163. Tantalò D.G. et al. Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies // *J Immunother Cancer*. 2021. Vol. 9, № 5. P. e002555.
164. Wölfel M., Greenberg P.D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8⁺ T cells. // *Nature protocols*. 2014. Vol. 9, № 4. P. 950–966.
165. Toebes M. et al. Generation of Peptide MHC Class I Monomers and Multimers Through Ligand Exchange // *Curr Protoc Immunol*. 2009. Vol. 87, № 1. P. 18.16.1-18.16.20.
166. Mamedov I.Z. et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. // *Frontiers in immunology*. 2013. Vol. 4. P. 456.
167. Pogorelyy M.V. et al. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires. // *PLoS computational biology*. 2017. Vol. 13, № 7. P. e1005572.
168. Thomas S., Stauss H.J., Morris E.C. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer // *Immunology*. 2010. Vol. 129, № 2. P. 170–177.

169. Nagarsheth N.B. et al. TCR-engineered T cells targeting E7 for patients with metastatic HPV-associated epithelial cancers // *Nat Med.* 2021. Vol. 27, № 3. P. 419–425.
170. Davis J.L. et al. Development of Human Anti-Murine T-Cell Receptor Antibodies in Both Responding and Nonresponding Patients Enrolled in TCR Gene Therapy Trials // *Clin Cancer Res.* 2010. Vol. 16, № 23. P. 5852–5861.
171. Cohen C.J. et al. Enhanced Antitumor Activity of T Cells Engineered to Express T-Cell Receptors with a Second Disulfide Bond // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 8. P. 3898–3903.
172. Roskopf S. et al. A Jurkat 76 based triple parameter reporter system to evaluate TCR functions and adoptive T cell strategies // *Oncotarget.* 2018. Vol. 9, № 25. P. 17608–17619.
173. Richardson C.D. et al. Non-homologous DNA increases gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7, № 1. P. 12463.
174. Janelle V. et al. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture // *Journal of Translational Medicine.* 2015. Vol. 13, № 1. P. 123.
175. Rajabzadeh A., Hamidieh A.A., Rahbarizadeh F. Spinoculation and retronectin highly enhance the gene transduction efficiency of Mucin-1-specific chimeric antigen receptor (CAR) in human primary T cells // *BMC Mol. Cell Biol.* 2021. Vol. 22, № 1. P. 57.
176. Sweeney N.P., Vink C.A. The impact of lentiviral vector genome size and producer cell genomic to gag-pol mRNA ratios on packaging efficiency and titre // *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 2021. Vol. 21. P. 574–584.
177. Stronen E. et al. Dendritic Cells Engineered to Express Defined Allo-HLA Peptide Complexes Induce Antigen-specific Cytotoxic T Cells Efficiently Killing Tumour Cells // *Scand J Immunol.* 2009. Vol. 69, № 4. P. 319–328.
178. Abrahamsen I. et al. Targeting B cell leukemia with highly specific allogeneic T cells with a public recognition motif // *Leukemia.* 2010. Vol. 24, № 11. P. 1901–1909.
179. Verdijk R.M. et al. Exclusive TCRVbeta chain usage of ex vivo generated minor Histocompatibility antigen HA-1 specific cytotoxic T cells: implications for monitoring of immunotherapy of leukemia by TCRBV spectratyping. // *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA.* 2002. Vol. 3, № 6. P. 271–275.
180. Gálvez J., Gálvez J.J., García-Peñarrubia P. Is TCR/pMHC Affinity a Good Estimate of the T-cell Response? An Answer Based on Predictions From 12 Phenotypic Models // *Front Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 349.
181. Campillo-Davo D., Flumens D., Lion E. The Quest for the Best: How TCR Affinity, Avidity, and Functional Avidity Affect TCR-Engineered T-Cell Antitumor Responses // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 7. P. 1720.
182. Yin Y., Li Y., Mariuzza R.A. Structural basis for self-recognition by autoimmune T-cell receptors // *Immunol Rev.* 2012. Vol. 250, № 1. P. 32–48.

183. Perreault C., Roy D.C., Fortin C. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones // *Immunol Today*. 1998. Vol. 19, № 2. P. 69–74.
184. Zheng Y., Fang Y.-C., Li J. PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity // *Oncol. Lett*. 2019. Vol. 18, № 5. P. 5399–5407.
185. Hicklin D.J., Marincola F.M., Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story // *Mol Med Today*. 1999. Vol. 5, № 4. P. 178–186.
186. Seki A., Rutz S. Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells // *Journal of Experimental Medicine*. 2018. Vol. 215, № 3. P. jem.20171626.
187. Roth T.L. et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting // *Nature*. 2018. Vol. 559, № 7714. P. 405–409.
188. Kallimasioti-Pazi E.M. et al. Heterochromatin delays CRISPR-Cas9 mutagenesis but does not influence the outcome of mutagenic DNA repair // *Plos Biol*. 2018. Vol. 16, № 12. P. e2005595.
189. Cabera A. et al. The sound of silence: Transgene silencing in mammalian cell engineering // *Cell Syst*. 2022. Vol. 13, № 12. P. 950–973.
190. McBride A. et al. The Role of Inhibition of Apoptosis in Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndrome // *Front. Oncol*. 2019. Vol. 9. P. 192.
191. Lu Y.-C. et al. Direct identification of neoantigen-specific TCRs from tumor specimens by high-throughput single-cell sequencing // *J Immunother Cancer*. 2021. Vol. 9, № 7. P. e002595.
192. Koedam J. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in acute myeloid leukemia // *Curr Opin Hematol*. 2022. Vol. 29, № 2. P. 74–83.
193. Zhang Y. et al. TCR engineered T cells for solid tumor immunotherapy // *Exp Hematology Oncol*. 2022. Vol. 11, № 1. P. 38.
194. Kozani P.S. et al. Recent Advances in Solid Tumor CAR-T Cell Therapy: Driving Tumor Cells From Hero to Zero? // *Front Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 795164.
195. Kailayangiri S. et al. Overcoming Heterogeneity of Antigen Expression for Effective CAR T Cell Targeting of Cancers // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 5. P. 1075.
196. June C.H. et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer // *Science*. 2018. Vol. 359, № 6382. P. 1361–1365.
197. Jiménez-Reinoso A. et al. Synthetic TILs: Engineered Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Improved Therapeutic Potential // *Frontiers Oncol*. 2021. Vol. 10. P. 593848.
198. Reinhard K. et al. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors // *Science*. 2020. Vol. 367, № 6476. P. 446–453.

199. Liu J. et al. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress // *J Hematol Oncol*. 2022. Vol. 15, № 1. P. 28.
200. Blankenstein T. et al. The determinants of tumour immunogenicity // *Nat Rev Cancer*. 2012. Vol. 12, № 4. P. 307–313.
201. Arnaud M. et al. The Promise of Personalized TCR-Based Cellular Immunotherapy for Cancer Patients // *Front Immunol*. 2021. Vol. 12. P. 701636.
202. Cameron B.J. et al. Identification of a Titin-Derived HLA-A1–Presented Peptide as a Cross-Reactive Target for Engineered MAGE A3–Directed T Cells // *Science Translational Medicine*. 2013. Vol. 5, № 197. P. 197ra103-197ra103.
203. Brickner A.G. Mechanisms of minor histocompatibility antigen immunogenicity // *Immunol Res*. 2006. Vol. 36, № 1–3. P. 33–41.
204. Shafer P., Kelly L.M., Hoyos V. Cancer Therapy With TCR-Engineered T Cells: Current Strategies, Challenges, and Prospects // *Front Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 835762.
205. Ott P.A. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma // *Nature*. 2017. Vol. 547, № 7662. P. 217.
206. Jonas B.A. On the origin of relapse in AML // *Sci Transl Med*. 2017. Vol. 9, № 398.
207. Griffioen M. et al. Genetic engineering of virus-specific T cells with T-cell receptors recognizing minor histocompatibility antigens for clinical application // *Haematologica*. 2008. Vol. 93, № 10. P. 1535–1543.
208. Heemskerk M.H. et al. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. // *Blood*. 2003. Vol. 102, № 10. P. 3530–3540.
209. Thomas S. et al. Framework engineering to produce dominant T cell receptors with enhanced antigen-specific function // *Nat Commun*. 2019. Vol. 10, № 1. P. 4451.
210. Safdari Y. et al. Antibody humanization methods – a review and update // *Biotechnology Genetic Eng Rev*. 2013. Vol. 29, № 2. P. 175–186.
211. Khan A.N. et al. Immunogenicity of CAR-T Cell Therapeutics: Evidence, Mechanism and Mitigation // *Front Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 886546.
212. Wagner D.L. et al. Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy // *Nat Rev Clin Oncol*. 2021. Vol. 18, № 6. P. 379–393.
213. Jensen M.C. et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. // *Biology Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010. Vol. 16, № 9. P. 1245–1256.
214. Legut M. et al. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells // *Blood*. 2017. Vol. 131, № 3. P. 311–322.

215. Eyquem J. et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection // *Nature*. 2017. Vol. 543, № 7643. P. 113.
216. Stadtmauer E.A. et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer // *Science*. 2020. Vol. 367, № 6481. P. eaba7365.
217. Kawalekar O.U. et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells // *Immunity*. 2016. Vol. 44, № 2. P. 380–390.
218. Wachsmann T.L.A. et al. Comparing CAR and TCR engineered T cell performance as a function of tumor cell exposure // *Oncoimmunology*. 2022. Vol. 11, № 1. P. 2033528.
219. Yee C. et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells // *Proc National Acad Sci*. 2002. Vol. 99, № 25. P. 16168–16173.
220. Chapuis A.G. et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. // *Science translational medicine*. 2013. Vol. 5, № 174. P. 174ra27.
221. Tawara I. et al. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS // *Blood*. 2017. Vol. 130, № 18. P. 1985–1994.
222. Abate-Daga D. et al. Expression profiling of TCR-engineered T cells demonstrates overexpression of multiple inhibitory receptors in persisting lymphocytes // *Blood*. 2013. Vol. 122, № 8. P. 1399–1410.
223. D'Angelo S.P. et al. Antitumor Activity Associated with Prolonged Persistence of Adoptively Transferred NY-ESO-1c259T cells in Synovial Sarcoma // *Cancer Discov*. 2018. Vol. 8, № 8. P. CD-17-1417.
224. Arcangeli S. et al. CAR T-cell manufacturing from naive/stem memory T-lymphocytes enhances antitumor responses while curtailing cytokine release syndrome // *J Clin Invest*. 2022.
225. Melenhorst J.J. et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells // *Nature*. 2022. Vol. 602, № 7897. P. 503–509.

ПРИЛОЖЕНИЕ

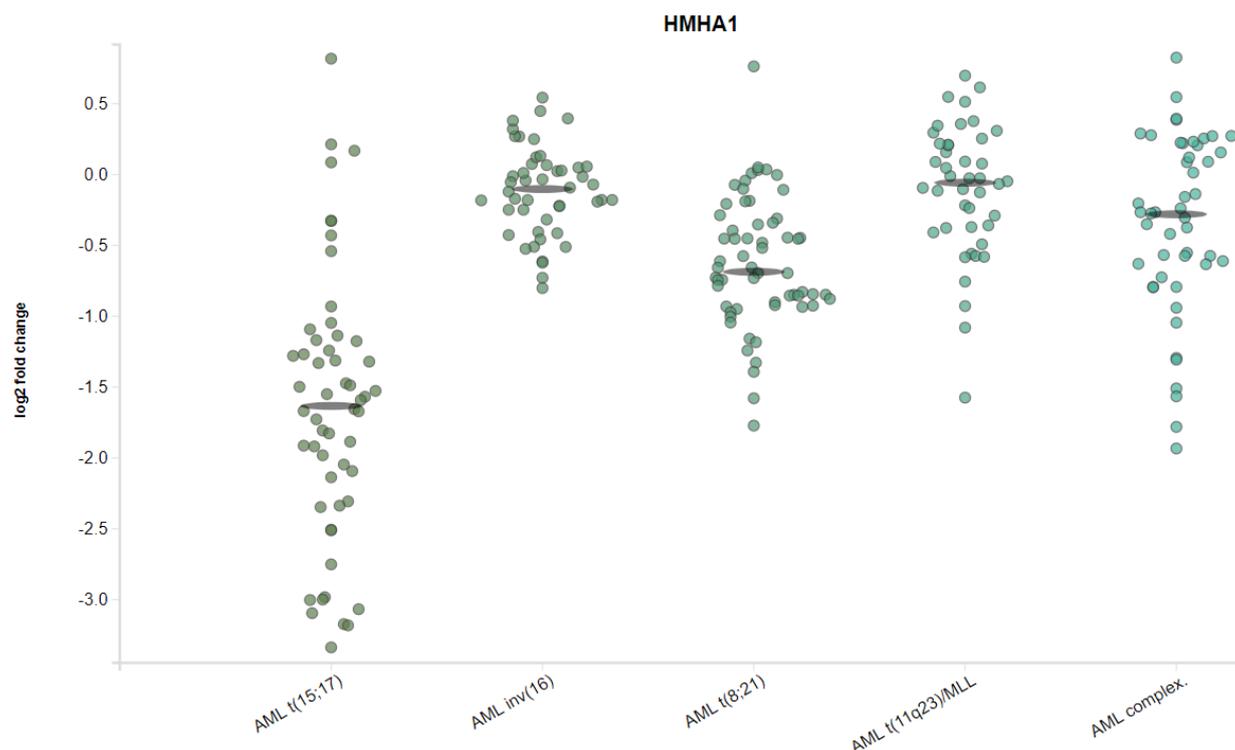


Рисунок 1 приложения. Изменение экспрессии *ARHGAP45* в клетках ОМЛ по сравнению со здоровыми гемопоэтическими клетками. Данные bloodspot.eu

Таблица 1 приложения. Исследование экспансий, специфичных к НА-1

Донор	Аллель HLA-A	Тип экспансии	Генотип по исследуемому МАГ	Количество позитивных по окраске тетрамером экспансий экспансии/всего экспансий	Метод получения антиген-специфичной фракции клеток	Клонированные субъединицы ТКР
P005	A*02 ⁺	Аутологичная	НА-1 ^{-/-}	10/35	Окраска тетрамером	11 альфа 10 бета
P845	A*02 ⁺	Аутологичная	НА-1 ^{-/-}	15/22	Рестимуляция	8 альфа 6 бета
P1102	A*02 ⁺	Аутологичная	НА-1 ^{-/-}	6/22	Окраска тетрамером	7 альфа 6 бета
P180	A*02 ⁺	Аутологичная	НА-1 ^{-/-}	3/15	Рестимуляция	Нет

P1221	A*02 ⁺	Аутологичная	HA-1 ^{-/-}	5/15	Окраска тетрамером	Нет
P196	A*02 ⁻	Аллогенная	HA-1 ^{-/-}	3/6	Окраска тетрамером	1 альфа 1 бета
P1329	A*02 ⁻	Аллогенная	HA-1 ^{-/-}	3/12	Окраска тетрамером	2 альфа 2 бета
P856	A*02 ⁻	Аллогенная	HA-1 ^{-/-}	1/6	Окраска тетрамером	Нет

Таблица 2 приложения. Исследование экспансий, специфичных к АСС-1У

Донор	Аллель HLA-A	Тип экспансии	Генотип по исследуемому МАГ	Количество позитивных лунок в экспансии/всего лунок	Метод получения антиген-специфичной фракции клеток	Клонированные субъединицы ТКР
P001	A*24+	Аутологичная	АСС-1 ^{C/C}	4/23	Рестимуляция	1 альфа 1 бета
P008	A*24+	Аутологичная	АСС-1 ^{C/C}	3/18	Рестимуляция	Нет

Таблица 3 приложения. Аминокислотные последовательности CDR3, V и J гены субъединиц ТКР, отобранных для клонирования

Донор	Субъединица	Название	Последовательность CDR3	V ген	J ген	Ячейка
p005	beta	w15 b1	CASSTLLHEQYF	TRBV7-9	TRBJ2-7	well_15
p005	beta	w11 b	CASSSGTVYNEQFF	TRBV7-9	TRBJ2-1	well_11
p005	beta	w3 b	CASLLSSYEQYF	TRBV7-9	TRBJ2-7	well_3
p005	beta	w5 b 1	CASSWTSARTDTQYF	TRBV7-9	TRBJ2-3	well_5
p005	beta	w15 b2	CASLTLTDTQYF	TRBV7-9	TRBJ2-3	well_15
p005	beta	w5 b2	CASSIGTQYF	TRBV7-9	TRBJ2-5	well_5
p005	beta	w15 b3	CASSTLLHEQYF	TRBV7-9	TRBJ2-7	well_15
p005	beta	w7b	CASSEQRGGGSQYF	TRBV9	TRBJ2-5	well_7
p005	beta	w6b	CASSLVSATLGTEAFF	TRBV7-9	TRBJ1-1	well_6
p005	beta	w15b4	CASSLVTDQPQHF	TRBV7-9	TRBJ1-5	well_15
p005	alpha	w5 a1	CAYRRVTGNQFYF	TRAV38-2DV8	TRAJ49	well_5
p005	alpha	w15 a1	CVVSGGGSQGNLIF	TRAV10	TRAJ42	well_15
p005	alpha	w5 a2	CILRGDNDYKLSF	TRAV26-2	TRAJ20	well_5
p005	alpha	w3 a	CALRGTGGFKTIF	TRAV19	TRAJ9	well_3
p005	alpha	w7 a	CAVHQNAGGTSYGKLTf	TRAV20	TRAJ52	well_7
p005	alpha	w11 a	CIVRGTSGTYKYIF	TRAV26-1	TRAJ40	well_11
p005	alpha	w5 a4	CAGHQLGSGAGSYQLTF	TRAV35	TRAJ28	well_5
p005	alpha	w15 a2	FRAFNAGNNRKLIF	TRAV25	TRAJ38	well_15
p005	alpha	w6 a	CASPSGAGSYQLTF	TRAV17	TRAJ28	well_6
p005	alpha	w15 a3	CAGPGGNTPLVF	TRAV25	TRAJ29	well_15
p005	alpha	w15 a4	CAEPPTYKYIF	TRAV29DV5	TRAJ40	well_15
p1102	beta	w15b	CASREAGRYEQYF	TRBV10-2	TRBJ2-7	well_15

p1102	beta	w8b1	CASIVLQGREKFF	TRBV7-9	TRBJ2-1	well_8
p1102	beta	w11b	CASSSGRSTGELFF	TRBV5-5	TRBJ2-2	well_11
p1102	beta	w8b2	CASSPRGGYGTF	TRBV6-1	TRBJ1-2	well_8
p1102	beta	w8b3	CASSLVAGVTEAFF	TRBV7-9	TRBJ1-1	well_8
p1102	beta	w3b	CASSLVFGEKLF	TRBV7-9	TRBJ1-4	well_3
p1102	alpha	w15 a	CAMRKPNAGNMLTF	TRAV14DV4	TRAJ39	well_15
p1102	alpha	w8 1a	CAADYQGNFVF	TRAV29DV5	TRAJ26	well_8
p1102	alpha	w8 2a	CAGPLNARLMF	TRAV35	TRAJ31	well_8
p1102	alpha	w8 3a	CYQGNFVF	TRAV13-1	TRAJ26	well_8
p1102	alpha	w8 4a	CAMREATSGTYKYIF	TRAV14DV4	TRAJ40	well_8
p1102	alpha	w11 a	CATHSIGGTSYGKLT	TRAV20	TRAJ52	well_11
p1102	alpha	w3 a	CAVGASGAGSYQLTF	TRAV8-3	TRAJ28	well_3
p845	beta	1 b	CASSLLDRVAEQYF	TRBV7-9	TRBJ2-7	W8
p845	beta	2 b	CASSLVVGTEAFF	TRBV7-9	TRBJ1-1	W7
p845	beta	3 b	CATLSGTVLNEQFF	TRBV7-9	TRBJ2-1	W4
p845	beta	4 b	CASSLLGSLETQYF	TRBV7-9	TRBJ2-5	W2_1
p845	beta	5 b	CASSRLAGGQTGELFF	TRBV7-9	TRBJ2-2	W2_2
p845	beta	6 b	CASSFVGAGNSPLHF	TRBV7-9	TRBJ1-6	W1
p845	alpha	1a	CATGNQFYF	TRAV17	TRAJ49	w8
p845	alpha	2a	CVVNRGTGRRALTF	TRAV12-1	TRAJ5	w7_1
p845	alpha	3a	CAGPQGNTPLVF	TRAV25	TRAJ29	w7_3
p845	alpha	4a	CAGYKSGAGSYQLTF	TRAV35*2	TRAJ28	w7_2
p845	alpha	5a	CATGMNYGGSQGNLIF	TRAV17	TRAJ42	w4_1
p845	alpha	6a	CIVRVTLIGFNVLHC	TRAV26-1	TRAJ35	w4_2
p845	alpha	7a	CAAYSGAGSYQLTF	TRAV23DV6	TRAJ28	w2
p845	alpha	8a	CATDERSGAGSYQLTF	TRAV17	TRAJ28	w1
p856	alpha	p856 alpha	CAVRTSGTYKYIF	TRAV21	TRAJ40	w4
p856	beta	p856 beta	CASSLGGYEQYF	TRBV12-3	TRBJ2-7	w4
p1329	alpha	p1329 alpha1	CVVSDLSRARLMF	TRAV8-2	TRAJ31	w6
p1329	beta	p1329 beta1	CASSTTGQGVPEQYF	TRBV7-9	TRBJ2-7	w6
p196	alpha	p196 alpha	CAATGGYQKVTF	TRAV12-2	TRAJ13	w3
p196	beta	p196 beta 2	CASSSPGIGAAIYEYF	TRBV7-9	TRBJ2-7	w3
p1329	alpha	p1329 alpha2	CALAGGYQKVTF	TRAV9-2	TRAJ13	w11
p1329	beta	p1329 beta2	CASSLSQETQYF	TRBV7-9	TRBJ2-5	w11

Таблица 4 приложения. Состав и функциональность изученных ТКР

TCR name	α-субъединица	β-субъединица	Ячейка	Донор	Функционален
ER1	1a	1b	8	p845	YES
ER3	7a	4b	2	p845	-
ER4	7a	5b	2	p845	YES
ER5	2a	2b	7	p845	-
ER6	3a	2b	7	p845	YES
ER7	4a	2b	7	p845	-

ER8	8a	6b	1	p845	YES
ER10	5a	3b	4	p845	-
ER11	6a	3b	4	p845	-
ER12	p1102 15a	p1102 15b	15	p1102	YES
ER13	p005 w7a	p005 w7b	7	p005	-
ER14	p005 w5a1	p005 w5b	5	p005	-
ER15	p1102 w8b1	p1102 w8a1	8	p1102	-
ER16	p1102 w8b1	p1102 w8a3	8	p1102	-
ER17	p1102 w8b1	p1102 w8a4	8	p1102	YES
ER18	p1102 w8b2	p1102 w8a2	8	p1102	-
ER19	p005 w3b	p005w3a	3	p005	-
ER20	p005 w6b	p005 w6a	6	p005	YES
ER21	p1102 w3b	p1102 w3a	3	p1102	-
ER22	p005 w11a	p005 w11b	11	p005	-
ER23	p1102 w11a	p1102 w11b	11	p1102	YES
ER24	p005 w5a2	p005 w5b1	5	p005	YES
ER25	p005 w5a4	p005w5b1	5	p005	-
ER26	p005 w5a1	p005 w5b2	5	p005	-
ER27	p005 w5a2	p005 w5b2	5	p005	-
ER28	p005 w5a4	p005 w5b2	5	p005	YES
ER29	p005 w15b3	p005 w15a3	15	p005	YES
ER30	p1102 w8b1	p1102 w8a2	8	p1102	-
ER31	p1102 w8b2	p1102 w8a1	8	p1102	-
ER32	p1102 w8b2	p1102 w8a3	8	p1102	-
ER33	p1102 w8b2	p1102 w8a4	8	p1102	-
ER34	p1102 w8b3	p1102 w8a1	8	p1102	-
ER35	p1102 w8b3	p1102 w8a2	8	p1102	-
ER36	p1102 w8b3	p1102 w8a3	8	p1102	-
ER37	p1102 w8 b3	p1102 w8a4	8	p1102	-
ER38	p005 w15b1	p005 w15a1	15	p005	-
ER39	p005 w15b1	p005 w15a2	15	p005	-
ER40	p005 w15b1	p005 w15a4	15	p005	-
ER41	p005 w15b2	p005 w15a1	15	p005	-
ER42	p005 w15b2	p005 w15a2	15	p005	-
ER43	p005 w15b2	p005 w15a4	15	p005	-
ER44	p005 w15b4	p005 w15a1	15	p005	-
ER45	p005 w15b4	p005 w15a2	15	p005	-
ER46	p005 w15b4	p005 w15a4	15	p005	-
PKS3	p1329 alpha1	p1329 beta1	6	p1329	YES
PKS11	p1329 alpha2	p1329 beta2	11	p1329	YES

Таблица 5 приложения. Диагноз пациентов, процент бластных клеток в образце крови, и цитотоксический ответ на образец

Номер пациента	Генотип HA-1	Диагноз	Процент бластов в образце	Киллинг CD8 лимфоцитами с ER28	Киллинг CD8 лимфоцитами с ER28 + пептид
p1876	отрицательный	ОМЛ	70%	5%	27%
p829	гетерозигота	ОМЛ	0.80%	12%	30%
p1825	отрицательный	ОМЛ	0.54%	1%	36%
p163	гетерозигота	ОМЛ (моноциты)	N/A	30%	55%
p2053	гетерозигота	ОМЛ	17.60%	37%	54%

p176	гетерозигота	ОМЛ (моноциты)	1.80%		
p1727	гомозигота	В-ОЛЛ	47.2%		
p925	отрицательный	ОМЛ	2.40%	6%	50%
p1368	гомозигота	ОМЛ	2%	32%	51%
p1900	отрицательный	ОЛЛ	60%	2%	2%
p2051	отрицательный	ОМЛ	67.60%	3%	34%
p2056	отрицательный	ОМЛ	70.40%	4%	42%
p854	гетерозигота	В-ОЛЛ	N/A		
p939	гомозигота	Mycosis fungoides	0	42%	60%
p187	гетерозигота	ХММЛ	N/A		
p1310	гетерозигота	ОМЛ	0	34%	48%
p1879	гетерозигота	ОМЛ	60%	11%	24%
p1364	гомозигота	ОМЛ	1%	23%	47%
p180	гетерозигота	ОМЛ	N/A		
p1885	гомозигота	ОМЛ	33.20%	44%	54%
p1884	гетерозигота	Т-ОЛЛ	95.60%	10%	28%
p1864	гомозигота	ОМЛ	37.20%	38%	45%
p1861	гомозигота	ОМЛ	78.80%	23%	38%
p1835	гетерозигота	В-ОЛЛ	95.60%	19%	27%
p1983	гетерозигота	ОМЛ	79.60%	31%	47%
p2055	гетерозигота	В-ОЛЛ	90.80%	28%	55%
p1900	A*02-негативный	ОЛЛ	N/A	2%	2%
p2044	A*02-негативный	ОМЛ	N/A	8%	12%
p2120	A*02-негативный	ОЛЛ	N/A	3%	2%
p300	A*02-негативный	Т-клеточная лимфома	N/A	2%	2%
p098	A*02-негативный	ОМЛ	N/A	5%	5%
p157	A*02-негативный	ОМЛ	N/A	6%	6%