

УДК 621.017.1:616-006

МОДИФИКАЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ РЕЦЕПТОРОМ, СПЕЦИФИЧНЫМ К МИНОРНОМУ АНТИГЕНУ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ АСС1-Y

© 2019 г. А. М. Пилунов^{a, b, *}, А. А. Кучмий^a, С. А. Шитиков^{a, b}, С. Ю. Филькин^a, Д. С. Романюк^a, Ф. Н. Розов^b, Г. А. Ефимов^{a, b}

^aНациональный медицинский исследовательский центр гематологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125167 Россия

^bБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119991 Россия

*e-mail: a.pilunov@gmail.com

Поступила в редакцию 05.10.2018 г.

После доработки 23.11.2018 г.

Принята к печати 29.11.2018 г.

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток — единственная существующая терапия, позволяющая полностью вылечить злокачественные заболевания кроветворной системы. Лимфоциты донора, содержащиеся в трансплантате, способны распознавать и уничтожать остаточные опухолевые клетки в процессе аллореактивного иммунного ответа, что снижает вероятность развития рецидива. Иммунный ответ может развиваться не только на несовпадающие аллели *HLA*, но и на чужеродные для донора пептиды, представленные в контексте общих для донора и реципиента молекул *HLA*. Такие полиморфные пептиды называются минорными антигенами гистосовместимости (МАГ), возникновение которых обусловлено наличием несинонимических однонуклеотидных полиморфизмов в геноме человека. Предполагается, что трансфузия Т-клеток, распознающих МАГ, презентуемых преимущественно в клетках гемопоэтического ряда, позволит направленно уничтожить остаточный опухолевый клон без нежелательного повреждения здоровых тканей организма. Иммунный ответ на МАГ может развиваться, если донор гомозиготен по одному аллелю полиморфизма, а реципиент гетерозиготен или гомозиготен по альтернативному аллелю. При оптимальной частоте аллельных вариантов иммуногенное несовпадение возникает в 25% случаев. МАГ АСС-1Y, появление которого обусловлено полиморфизмом в гене *BCL2A1*, имеет близкую к теоретическому максимуму вероятность иммуногенного несовпадения. *BCL2A1* экспрессируется на высоком уровне в клетках опухолей гемопоэтической системы, а пептид АСС-1Y презентуется в контексте аллеля *HLA-A*24:02*, распространенного в русской популяции с относительно высокой частотой. Сочетание этих факторов делает МАГ АСС-1Y многообещающей мишенью для иммунотерапии. Одним из перспективных методов посттрансплантационной терапии лейкозов и профилактики рецидивов считается трансфузия CD8⁺ Т-лимфоцитов донора, несущих рекомбинантный Т-клеточный рецептор, специфичный к МАГ. Путем антигенспецифичной экспансии Т-лимфоцитов здорового АСС-1Y^{-/-}-донора нами получена последовательность высокоаффинного Т-клеточного рецептора, специфичного к МАГ АСС-1Y. Сконструирован лентивирусный вектор, несущий рекомбинантный ген Т-клеточного рецептора. Показано, что трансдуцированные CD8⁺ Т-лимфоциты обладают специфической цитотоксичностью в отношении клеток-мишеней, представляющих АСС-1Y. Предполагается, что модифицированные подобным образом CD8⁺ Т-лимфоциты могут использоваться в терапии посттрансплантационных рецидивов гемобластозов.

Ключевые слова: лейкозы, минорные антигены гистосовместимости, адоптивный перенос, модификация лимфоцитов

DOI: 10.1134/S0026898419030145

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) широко используется в терапии злокачественных заболеваний гемопоэтической системы. Лимфоциты донора,

содержащиеся в трансплантате, восстанавливают иммунную систему реципиента, они способны распознавать оставшиеся опухолевые клетки как чужеродные и уничтожить их в процессе реакции “трансплантат против опухоли” (РТПО). При отсутствии РТПО вероятность развития рецидива

значительно возрастает. У отдельных категорий пациентов она доходит до 80% и является основной причиной смертности после трансплантации [1].

Аллореактивные лимфоциты могут также атаковать здоровые клетки реципиента, что вызывает реакцию “трансплантат против хозяина” (РТПХ) [1]. Основной причиной РТПХ считается несовпадение донора и реципиента по генам *HLA*. Тем не менее, РТПХ может возникнуть и при аллотГСК от полностью *HLA*-совместимого донора и служит причиной неблагоприятного исхода в 13% случаев [1]. При *HLA*-совместимой трансплантации РТПХ и РТПО возникают на минорные антигены гистосовместимости (МАГ) [2].

МАГ – это пептиды, которые презентуются в контексте молекул *HLA* и различаются по аминокислотной последовательности у донора и реципиента, что обусловлено несинонимическими однонуклеотидными полиморфизмами (нсОМП) [3].

Т-лимфоциты донора способны распознавать пептидные антигены, различающиеся одним аминокислотным остатком, и инициировать аллореактивный иммунный ответ [4]. При аллотГСК происходит полная замена кроветворной системы реципиента на донорскую, поэтому МАГ, специфически экспрессируемые в гемопоэтической ткани, могут использоваться в качестве мишени для посттрансплантационной иммунотерапии [5]. Такая терапия направлена на уничтожение оставшихся после кондиционирования злокачественных клеток реципиента и профилактики рецидива заболевания.

Оптимальный терапевтический эффект аллотГСК достигается, когда повреждение здоровых тканей, вызванное РТПХ, отсутствует или минимально, а РТПО приводит к полному уничтожению злокачественных клеток. Установлено, что РТПО в этих случаях направлена на гемопоэтические клетки реципиента, экспрессирующие МАГ [3]. Показано, что из 6000 потенциальных МАГ лишь 39 представляют собой хорошие терапевтические мишени [6]. Чтобы стать клинически значимой мишенью, МАГ должны соответствовать ряду требований. Поскольку презентуемые пептиды рестрицированы по конкретному аллелю *HLA*, клинически релевантные МАГ должны презентироваться одним из распространенных *HLA*-аллелей. Соотношение частот аллельных вариантов МАГ в популяции должно быть оптимальным, чтобы вероятность иммуногенного различия донора и реципиента по МАГ была наибольшей. Для возникновения иммунного ответа донор должен быть гомозиготным по одному аллелю гена МАГ, а реципиент – гетерозиготным или гомозиготным по альтернативному. При оптимальном соотношении частот аллелей подобная ситуация возникает в 25% случаев [7]. Чтобы достичь РТПО без возникновения РТПХ, МАГ

должны экспрессироваться в опухолевых клетках на значительно более высоком уровне, чем в других клетках организма.

МАГ АСС-1Y и АСС-1С происходят из аллельных вариантов гена *BCL2A1*. Этот ген сверхэкспрессируется в клетках многих лейкозов, а иммунный ответ на АСС-1Y индуцирует развитие РТПО без РТПХ [8]. МАГ АСС-1Y и АСС-1С имеют последовательности DYLQYVLQI и DYLQCVLQ, соответственно, при этом иммуногенным является пятый аминокислотный остаток. Оба аллельных варианта презентуются в *HLA*, иммунный ответ происходит за счет дискриминации пептидов Т-клеточным рецептором (ТКР) и может развиваться в обе стороны. В тимусе донора с генотипом АСС-1^{C/C} будет презентироваться только пептид АСС-1С, и все Т-клетки, распознающие АСС-1С, будут элиминированы в ходе селекции, тогда как клетки, распознающие АСС-1Y, могут выжить. И наоборот, в тимусе донора с генотипом АСС-1^{Y/Y} пройти селекцию смогут только АСС-1С-специфичные Т-лимфоциты.

МАГ АСС-1Y и АСС-1С презентуются в контексте аллеля *HLA-A*24:02*. Согласно опубликованным данным (<http://www.allelefreqencies.net>), в русской популяции частота данного аллеля составляет примерно 0.12. По данным проекта “1000 Геномов” (<http://www.internationalgenome.org/>) частоты аллелей нсОМП, кодирующих АСС-1Y и АСС-1С, в европейской популяции составляют 0.26 и 0.74 соответственно. Таким образом, около трети пар донор-реципиент имеют клинически значимое несовпадение по МАГ АСС-1Y или АСС-1С [7]. Вероятность иммуногенного несовпадения, когда донор имеет генотип АСС-1^{C/C}, а реципиент – АСС-1^{Y/Y} или АСС-1^{Y/C}, составляет 25%. Вероятность случая, когда реципиент имеет генотип АСС-1^{Y/C} или АСС-1^{C/C}, а донор – АСС-1^{Y/Y}, составляет лишь 6%. Таким образом, АСС-1Y представляет более привлекательную мишень для иммунотерапии, чем АСС-1С.

Один из подходов к использованию МАГ как мишеней клеточной терапии заключается в проведении антигенспецифической экспансии с последующей трансфузией полученных клеток. Показано, что введение Т-лимфоцитов, специфичных к МАГ HA-1, пациентам с рецидивом лейкоза позволяет добиться частичной ремиссии без возникновения РТПХ [9]. Это клиническое исследование подтверждает возможность использования МАГ как мишеней для иммунотерапии лейкозов. К недостаткам метода относится то, что экспансия может содержать более одного клона, что увеличивает шансы на развитие РТПХ и гиперцитокинемии.

Альтернативный подход состоит в получении лимфоцитов с заданной специфичностью путем внедрения генетической последовательности, ко-

дирующей рецептор, распознающий нужный антиген [10]. Как и в клетках CAR-T, для доставки используют вирусный вектор [11]. Показано, что Т-лимфоциты, трансдуцированные вектором, кодирующим ТКР, специфичный к антигену HA-1, обладают специфической цитотоксической активностью в отношении лимфобластоидных клеток, презентующих данный МАГ. Показана также цитотоксичность в отношении лейкозных клеток пациента, но не клеток, не экспрессирующих HA-1. Наблюдали также отсутствие кросс-реактивности в отношении клеток, несущих другие аллели *HLA*. Таким образом, алло-ТГСК, совмещенная с адоптивным переносом Т-клеток с рекомбинантным ТКР, специфичным к МАГ, может использоваться как эффективное и специфичное средство терапии лейкозов и профилактики их рецидива.

Этапы разработки подхода к клеточной терапии, направленной на предотвращение рецидивов лейкозов, включают: 1) выявление Т-лимфоцитов, специфичных к МАГ, 2) определение нуклеотидных последовательностей, кодирующих α и β -цепи их ТКР, 3) клонирование этих последовательностей в лентивирусную конструкцию, 4) трансдукцию Т-лимфоцитов. Лентивирусная трансдукция – метод генной модификации, разрешенный для клинического использования, считается более безопасным, чем модификация гаммаретровирусными векторами, поскольку лентивирус не имеет тенденции к интеграции в участки генома, кодирующие известные онкогены [12].

Таким образом, алло-ТГСК, совмещенная с адоптивным переносом Т-клеток, модифицированных ТКР, специфичными к МАГ, может использоваться как эффективное и специфичное средство терапии и профилактики рецидива лейкозов. Модифицированные CD8⁺ Т-клетки, обладающие специфичностью против одного или нескольких МАГ, можно ввести больным как одновременно с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, так и в виде дополнительной инфузии при развитии рецидива.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дифференцировка дендритных клеток из моноцитов периферической крови. Фракцию мононуклеарных клеток (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) выделяли из 30 мл периферической крови методом центрифугирования на градиенте плотности фикола (“ПанЭко”, Россия). Для адгезии моноцитов на культуральный пластик PBMC культивировали в матрасе T25 (83.1810, “Sarstedt”, Германия) в течение 4 ч в 4 мл полной среды RPMI 1640, содержащей 10% человеческой сыворотки, пенициллин/стрептомицин/глутамин (“Thermo Fisher Scientific”, США) и 1 мМ пирувата натрия (“Thermo Fisher Scientific”) при 3°C и

5% CO₂. Неадгезированные клетки отмывали культуральной средой. К моноцитам, прилипшим к пластику, добавляли полную дифференцировочную среду Gibco™ RPMI 1640, содержащую 800 ед./мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и 10 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4, “Miltenyi Biotec”, Германия).

Моноциты дифференцировались в дендритные клетки (ДК) в течение 3 дней, после чего зрелые ДК нагружали синтетическим пептидом ACC-1Y или ACC-1C в концентрации 10 нг/мл в активирующей среде, содержащей 800 ед./мл GM-CSF, 10 нг/мл IL-4, 10 нг/мл липополисахарида, 100 ед./мл IFN- γ . После инкубации в течение 16 ч ДК снимали с пластика при помощи фосфатного буфера, содержащего 2 мМ EDTA, и клеточного скребка, обрабатывали рентгеновским излучением в течение 50 мин суммарной дозой 50 Гр.

Получение и экспансия антигенспецифичных Т-клеток. Здоровых доноров, несущих аллель *HLA-A*24*, генотипировали по нсОHP в гене *BCL2A1* описанным ранее методом [13]. Из 50 мл крови донора, несущего аллель *HLA-A*24*, и гомозиготного по МАГ ACC-1C выделяли сначала PBMC, затем наивные Т-лимфоциты при помощи набора для наивных CD8⁺ Т-клеток (130-093-244 “Miltenyi Biotec”) в соответствии с протоколом производителя: за отрицательной селекцией клеток, несущих маркеры CD45RO⁺, CD56⁺, CD57⁺, CD244⁺, следовала положительная селекция CD8⁺ клеток [14] с помощью антител, конъюгированных с магнитными частицами. Выделенные наивные цитотоксические Т-клетки смешивали с облученными активированными ДК, полученными от того же донора, в соотношении 2 : 1 или 4 : 1 (Т-лимфоциты : ДК) [14]. Клетки рассаживали на 6-луночные культуральные планшеты (“Sarstedt”) по 1 × 10⁶ CD8⁺ наивных Т-лимфоцитов на лунку. В первый день клетки культивировали в стандартной среде с добавлением IL-21 (“Miltenyi Biotec”) в концентрации 30 нг/мл. На 3, 5 и 7 день добавляли цитокины IL-7 и IL-15 (“Miltenyi Biotec”) по 5 нг/мл каждого. Клетки культивировали в течение 10 дней.

Получение лимфобластоидных клеточных линий в качестве антигенпрезентирующих клеток. Для создания аутологичной лимфобластоидной клеточной линии (B-LCL) из крови донора в градиенте плотности фикола выделяли лимфоциты, после чего фракцию PBMC осаждали в центрифуге и разводили в 3 мл раствора, содержащего ~3 × 10⁶ частиц вируса Эпштейна–Барр. После 24 ч инкубации при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе к суспензии добавляли среду RPMI 1640, содержащую 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS, NuClone™, “GE Healthcare”, США) и 200 нг/мл цик-

лоспорина А. Спустя 2 недели клетки переводили в среду, содержащую 10% FBS.

Проточная цитофлуориметрия. Для определения антигенной специфичности культур Т-клеток на 10–12 день культивирования из каждой лунки отбирали по 1×10^6 клеток для окрашивания МНС-тетрамерами, конъюгированными с флуорохромами и нагруженными АСС-1У. Эти МНС-тетрамеры получены нами согласно протоколу, приведенному в [15, 16]. Векторы рЕТ3а и рМВio, содержащие гены $\beta 2$ -микрोगлобулина и *HLA-A*24:02*, соответственно, любезно предоставлены Ton Schumacher (Netherlands Cancer Institute).

Сборка МНС-тетрамеров из мономеров: 200 нг МНС-мономеров, конъюгированных с биотином, инкубировали с 200 нг стрептавидин-фикоэритрина (“Thermo Fisher Scientific”) в 10 мкл фосфатного буфера с добавлением 0.5% бычьего сывороточного альбумина (“Merck”, Германия) и 2 мМ EDTA (PBS/BSA/EDTA) в течение 45 мин в темноте на льду. Клеточные суспензии окрашивали в объеме 20 мкл течение 45 мин на льду в темноте. Затем культуры окрашивали антителами для проточной цитофлуориметрии в 50 мкл буфера в течение 15 мин на льду. В данной работе использовали антитела мыши к антигенам человека: анти-CD3 Alexa Fluor® 700 (BD557943), анти-CD8 PerCP-Cy™5.5 (BD565310), анти-CCR7 APC-R700 (BD560619), анти-CD45RO PE-Cy™7 (BD337168) (“BD Biosciences”, США), анти-CD137 PE(12-1379-42, eBioscience™, США). Живые и мертвые клетки разделяли также с использованием интеркалирующего красителя йодида пропидия (PI, “Thermo Fisher Scientific”). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II.

Внутриклеточное окрашивание на IFN- γ проводили по следующему протоколу. Клетки окрашивали на поверхностные маркеры анти-CD3-антителами в 100 мкл PBS/BSA/EDTA, после чего отмывали и фиксировали в 2%-ном растворе параформальдегида в PBS в течение 30 мин на льду. Затем клетки пермеабелизировали, добавляя раствор BD Cytoperm 1X (“BD Biosciences”). Окрашивание проводили в 100 мкл 1X BD Cytoperm, содержащем 2 мкл антител против IFN- γ -, в течение 30 мин.

Цитотоксичность. Функциональную активность антигенспецифичных CD8⁺ Т-клеток определяли, используя тесты на цитотоксические свойства и тест для оценки продукции IFN- γ . Предварительно клетки лимфобластической линии (В-LCL) нагружали синтетическим пептидом АСС-1У (10 мМ в течение 1 ч, 1×10^6 клеток/мл). Для проверки антигенспецифичного распознавания и цитотоксического действия CD8⁺ Т-клетки культивировали совместно с клетками В-LCL,

нагруженными 10 мМ АСС-1У в соотношении 5 : 1, по 150×10^3 Т-клеток и 30×10^3 LCL в объеме 200 мкл. Клетки инкубировали в течение 4 ч в инкубаторе при 37°C и 5%-ном содержании CO₂. Затем клеточную смесь окрашивали йодидом пропидия (2 мкг/мл) и аннексином V-FITC (2 мкл на пробу) (“BD Biosciences”) в специальном аннексинсвязывающем буфере в течение 15 мин в темноте на льду. К смеси добавляли анти-CD3-антитела, чтобы исключить из анализа эффекторные клетки и регистрировать клеточную гибель только в CD3-фракции (В-LCL) при помощи проточной цитофлуориметрии. Клетки, вступившие в апоптоз, окрашивались аннексином и не окрашивались йодидом пропидия; подвергшиеся некрозу клетки окрашивались положительно по обоим маркерам. Процент гибели клеток-мишени рассчитывали как сумму процентов некротических и апоптотических клеток.

Для анализа продукции IFN- γ цитотоксические Т-клетки (150×10^3) в течение 12 ч стимулировали 30×10^3 В-LCL, нагруженных пептидом АСС1-У в концентрации 10 мМ, как описано выше. В анализ включены контрольные лунки, содержащие только В-LCL, только Т-клетки, В-LCL, нагруженные неиммуногенным пептидом. В качестве положительного контроля использовали также Т-клетки, стимулированные 2.5 мкг/мл фитогемагглютинина, вызывающего неспецифичную суперантигенную активацию Т-клеток и продукцию IFN- γ . Через 12 ч IFN- γ был окрашен внутриклеточно, как описано выше.

Внеклеточное окрашивание на IFN- γ . Внеклеточное окрашивание на IFN- γ проводят с помощью набора IFN- γ Secretion Assay (130-054-202 “Miltenyi Biotec”). В тесте используют 10^6 лимфоцитов из культуры после лентивирусной трансдукции трансгенным ТКР. Для антигенспецифичной стимуляции используют 5×10^5 облученных LCL, нагруженных или ненагруженных пептидом АСС-1У, экспрессирующих *HLA-A*24* и презентующих эндогенный пептид АСС-1С. Трансдуцированные клетки стимулируют в течение 16 ч. Клетки инкубируют в 24-луночной планшете в 1 мл среды RPMI с 10% человеческой сыворотки и 10 ед./мл IL-2. После стимуляции образец отмывают в холодном буфере PBS/BSA/EDTA и ресуспендируют в 90 мкл холодной среды RPMI с 10%-ной человеческой сывороткой. Добавляют 10 мкл IFN- γ Catch Reagent (IFN- γ Secretion Assay, “Miltenyi Biotec”) и инкубируют в течение 5 мин на льду. Добавляют 1 мл теплой среды и инкубируют в течение 45 мин при 37°C и постоянном помешивании. За это время интерферон, секретлируемый клетками, связывается с IFN- γ Catch Reagent на поверхности клетки. Далее клетки промывают холодным буфером и осаждают центрифугированием при 4°C. Осадок ресуспендируют

ют в 90 мкл буфера, добавляют 10 мкл антител, меченных флуоресцентным красителем APC Reagent (IFN- γ Secretion Assay, "Miltenyi Biotec"), специфичных к IFN- γ . Таким образом происходит специфическое окрашивание клеток-продуцентов интерферона. Клетки инкубируют в течение 10 мин на льду с антителом к IFN- γ , отмывают буфером. IFN- γ -продуцирующие клетки детектируют методом проточной цитофлуориметрии.

Секвенирование генов α - и β -цепей Т-клеточного рецептора. После культивирования с ДК АСС-1У-специфичные Т-клетки окрашивают тетрамером, конъюгированным с флуорохромом PE. Тетрамер-позитивные клетки выделяют с использованием набора для магнитной сепарации с помощью антител, специфичных к PE и конъюгированных с магнитными частицами ("IBA Lifesciences", Германия) в соответствии с протоколом производителя. Клетки собирают центрифугированием и лизируют в 0.5 мл TRIzol LS Reagent ("Thermo Fisher Scientific"). Затем из лизата экстрагируют РНК в соответствии с протоколом производителя. Первую цепь кДНК, кодирующей α - и β -цепи ТКР, синтезируют с использованием РНК-зависимой-ДНК-полимеразы (MINT-ревертаза, "Евроген", Россия), РНК, полученной из лизата (1 мкг), в качестве матрицы и протокола с праймерами, представленными в [17]. Затем следуют две последовательных ПЦР с использованием Encyclo-полимеразы и праймеров из набора Mint RACE primer set ("Евроген"). Праймеры для клонирования нуклеотидной последовательности, кодирующей α -цепь: прямой – TATAGAATTCATGACATCCATTCGAGCTGT и обратный – GCTGGACCACAGCCG-CAGCG. Праймеры для клонирования нуклеотидной последовательности, кодирующей β -цепь: прямой – GCCGGCGACGTGGAAGAG-AACCCTG-GACCAATGAGCATCGGCCTCCTGTG и обратный – TAGACTCGAGTCGAAATCSTTTCTTTGAC. С помощью этих праймеров получают последовательности, кодирующие α - и β -цепи ТКР, включая лидерный пептид, вариабельную и константную части.

ПЦР-продукты, кодирующие α - и β -цепи ТКР, секвенировали. Данные секвенирования обрабатывали при помощи программного обеспечения Международной информационной системы ImMunoGeneTics (<http://www.imgt.org/>) и программы CLC Genomics Workbench 7.

Клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих α - и β -цепи Т-клеточного рецептора в лентивирусный вектор. Нуклеотидные последовательности, кодирующие α - и β -цепи ТКР, клонировали в экспрессионный лентивирусный вектор Plenti6/V5-DEST ("Invitrogen", США). Для обеспечения эквимольной экспрессии последовательности, кодирующие α - и β -цепи ТКР, объединяли с помощью двухстадийной ПЦР, при

этом между цепями была встроена последовательность, кодирующая 2А пептид. Трансляция единой аминокислотной последовательности прерывается между остатками 19 и 20 2А пептида [18]. В результате белковый продукт, находящийся со стороны N-конца от 2А пептида, покидает рибосому вместе с первыми 19 аминокислотами 2А пептида, и синтез продолжается с того же места. Таким образом, с одной мРНК можно экспрессировать несколько белков.

Получение лентивирусного супернатанта. Лентивирусные частицы получали с использованием системы экспрессии ViraPower™ ("Invitrogen"). Клетки линии НЕК 293Т (ATCC® CRL-3216™) культивировали в среде DMEM ("Gibco", Великобритания) с 10% FBS. За день до трансфекции клетки рассаживали с плотностью 5 млн. на культуральный флакон Т75 ("Sarstedt"). Трансфекцию проводили в соответствии с протоколом производителя. После трансфекции клетки растили в инкубаторе в течение 48 ч, затем собирали вирус-содержащий супернатант и преципитировали его на полиэтиленгликоль (ПЭГ-8000). К 10 мл супернатанта добавляли 3.4 мл 40%-ного раствора ПЭГ-8000, содержащего 7% NaCl, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 4 ч при 4°C и постоянном перемешивании. Далее центрифугировали при 1600 g и 4°C в течение 1 ч. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 1 мл среды RPMI-1640 ("Gibco").

Лентивирусная трансдукция. Фракцию CD8⁺ Т-клеток выделяли из крови здорового донора с помощью набора для магнитной сепарации (130-096-495 "Miltenyi Biotec"). Лимфоциты культивировали в 24-луночном планшете с плотностью 5 млн./мл с добавлением частиц, несущих антитела к CD3/2/28 ("Miltenyi Biotec"), согласно протоколу производителя. После 24 ч культивирования в CO₂-инкубаторе проводили лентивирусную трансдукцию методом спинфекции. К активированным лимфоцитам добавляли концентрированный лентивирусный супернатант в соотношении 1 млн. клеток на 1 мл супернатанта. К 1 мл суспензии добавляли 1 мкл раствора Polybrene ("Merck") и 10 ед. IL-2 (Ронколейкин, Россия). Планшеты с клетками центрифугировали в течение 90 мин при 900 g и 32°C. После спинфекции клетки инкубировали в течение 16 ч в CO₂-инкубаторе. Затем среду заменяли на RPMI с добавлением 10%-ной человеческой сыворотки и 10 ед. IL-2 и инкубировали в течение 48 ч. После этого трансдуцированные клетки использовали в функциональном тесте на внеклеточную секрецию IFN- γ .

Количественная ПЦР. Количество интеграций вируса на геном измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР). Генетическую ДНК из трансдуцированных клеток вы-

деляли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit ("Thermo Scientific") согласно протоколу производителя. В реакции ОТ-кПЦР использовали 30–60 нг геномной ДНК. Для определения числа интегрированных в геном копий вируса использовали праймеры, специфичные к гену *rev*. Количество копий клеточного генома оценивали с использованием праймеров, специфичных к гену $\beta 2$ -микроглобулина. Реакционная смесь содержала праймеры и флуоресцентные зонды, специфичные к каждому из генов. Количество копий матрицы в реакции оценивали по значению *C_q*. Среднее число интеграций вектора в геном оценивали по соотношению числа копий геномной и провирусной ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прямое выделение АСС-1У-специфичных клонов из пула наивных Т-клеток не представляется возможным в связи с малым количеством АСС-1У-специфичных наивных Т-клеток в крови (неопубликованные данные) и с недостаточной чувствительностью прямых методов определения. Так, изучение пулов наивных Т-клеток, способных распознавать вирусные антигены, показало, что частота наивных антигенспецифичных Т-клеток находится в диапазоне от 0 до 100 на 1×10^6 наивных лимфоцитов [19]. При частоте наивных предшественников, слишком низкой для прямых методов оценки, применяли антигензависимую экспансию Т-лимфоцитов, после которой можно детектировать антигенспецифичные лимфоциты.

Антигенную стимуляцию проводили путем культивирования наивных ($CCR7^+CD45RO^-$) $CD8^+$ Т-клеток с активированными аутологичными ДК, нагруженными синтетическим пептидом АСС-1У. В качестве донора $CD8^+$ Т-клеток выбирали носителя генотипа АСС-1^{c/c} и аллеля *HLA-A*24*. Наивные лимфоциты подразделяли на шесть независимых субпопуляций (по 5×10^5 наивных Т-лимфоцитов в каждой) таким образом, чтобы в одну лунку попало не больше одного антигенспецифичного Т-лимфоцита.

После 10-дневного культивирования с добавлением цитокинов – IL-21, -7, -15, в одной из субпопуляций детектированы АСС-1У-специфичные Т-лимфоциты (рис. 1а). Это позволяет предположить, что антигенспецифичные клетки моноклональны. В остальных субпопуляциях, а также в контрольных экспансиях, проходивших без пептида (рис. 1б) или при стимуляции пептидом АСС-1С (рис. 1в), окраска тетрамером не выявила АСС-1У-специфичные лимфоциты.

АСС-1У-специфичные Т-клетки выделяли с помощью магнитной сепарации через 17 дней после начала культивирования. Полученная культу-

ра практически полностью состояла из АСС-1У-специфичных лимфоцитов (рис. 1з).

Чтобы подтвердить антигенную специфичность Т-клеточной культуры, а также показать ее эффекторную функцию, мы проанализировали способность АСС-1У-специфичной культуры продуцировать IFN- γ в ответ на антигенную стимуляцию, а также ее цитотоксическую активность в отношении клеток-мишеней.

После стимуляции клетками аутологичной лимфобластоидной линии, нагруженной пептидом, АСС-1У-специфичная культура Т-лимфоцитов вырабатывает IFN- γ , тогда как стимуляция контрольным пептидом АСС-1С такого эффекта не вызывает. Контрольная культура, которую изначально стимулировали пептидом АСС-1С, не отвечает на оба пептида (рис. 2а). Кроме того, клеточная культура способна распознавать и путем цитотоксического лизиса уничтожать клетки-мишени, которые представляют на своей поверхности молекулы АСС-1У, в то время как в отсутствие антигена цитотоксичность не наблюдается (рис. 2б). Таким образом, полученная клеточная культура содержит клоны с ТКР, специфичными для антигена АСС-1У, и обладает эффекторными функциями.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие α - и β -цепи ТКР, специфичного к АСС-1У, были клонированы из культуры Т-лимфоцитов, обогащенной путем магнитной сепарации на АСС-1У-тетрамере. Секвенирование по Сэнгеру подтвердило присутствие в культуре одного доминантного клона. С помощью программы ImMunoGeneTics идентифицированы варибельные гены α - и β -цепей, входящих в данный ТКР. α -Цепь ТКР кодируется аллелями *TRAV131*02* и *TRAJ3*01*, а β -цепь – аллелями *TRBV6-5*01*, *TRBD2*02* и *TRBJ1-3*01*. Последовательности генов α - и β -цепей ТКР, специфичного к АСС-1У, клонированы в лентивирусный вектор (рис. 3 и Приложение, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2019/3/supp_Pilunov_rus.pdf).

Вирусные частицы, несущие ген *TKP*, получали путем преципитации вирусосодержащего супернатанта на ПЭГ-8000. Титрование на клетках линии НЕК293Т и определение среднего числа интеграций вектора в геном показало, что титр вируса составляет 2×10^6 инфицирующих частиц на 1 мл концентрата.

$CD8^+$ Т-лимфоциты здорового донора трансдуцировали лентивирусной конструкцией. Множественность заражения составила в среднем две инфекционные частицы на клетку. Спустя 48 ч после трансдукции клетки кокультивировали с облученными В-LCL с пептидом АСС-1У или без него в течение 16 ч. Результаты внеклеточного окрашивания на IFN- γ подтвердили специфическую активацию трансдуцированных $CD8^+$ Т-кле-

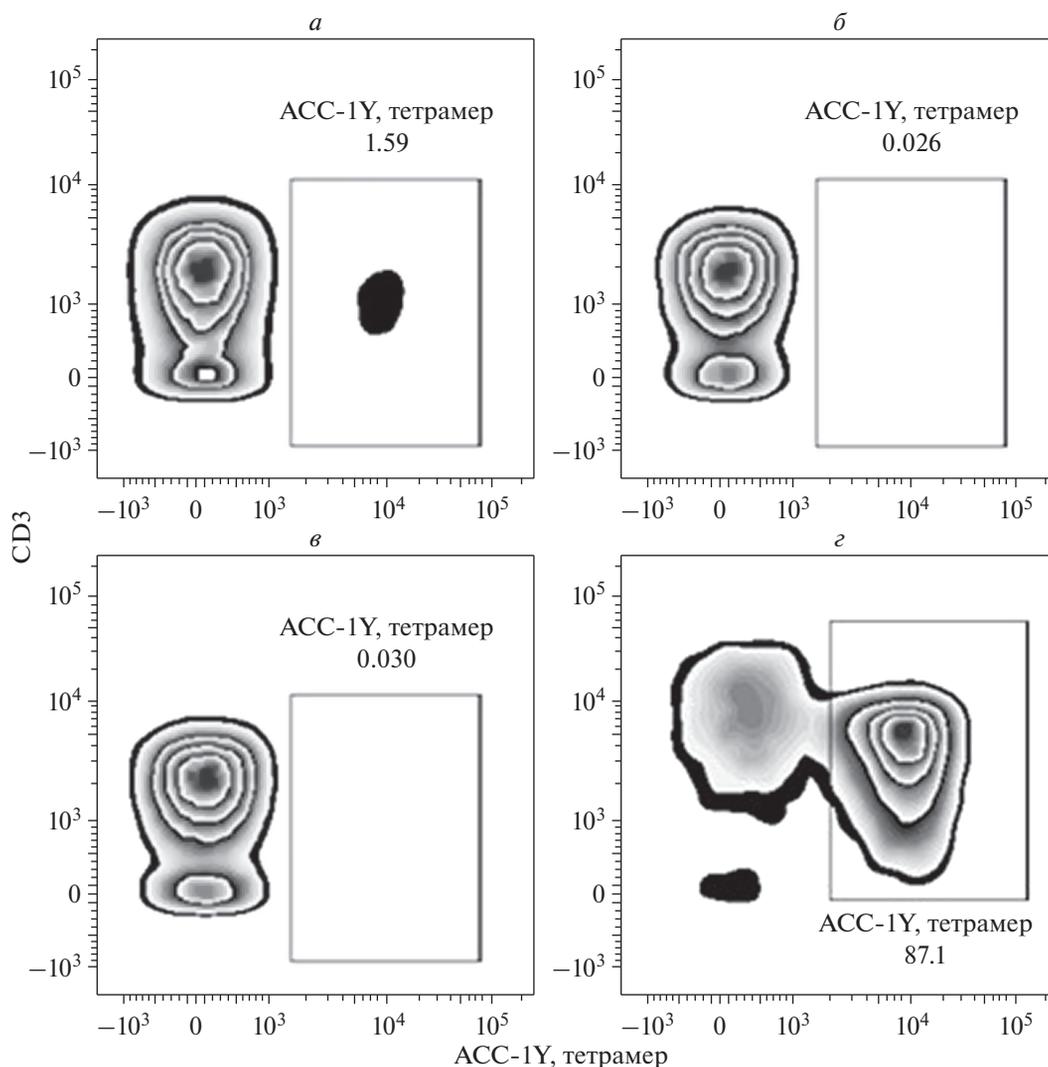


Рис. 1. ACC-1Y-специфичная экспансия CD8⁺ Т-лимфоцитов. Окраска тетрамером ACC-1Y Т-лимфоцитов, культивируемых с пептидом ACC-1Y (а), без пептида (б), с пептидом ACC-1C (в). Окраска тетрамером ACC-1Y культуры клеток, обогащенной магнитной сепарацией (г).

ток в ответ на антигенную стимуляцию (рис. 4). В то же время, инкубация с клетками-мишенями, не презентующими ACC-1Y (но презентующими эндогенный пептид ACC-1C), не вызывала секреции IFN- γ . Количество интеграций вируса в клеточный геном в трансдуцированной культуре составило примерно одну интеграцию на 100 клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами определена нуклеотидная последовательность, кодирующая α - и β -цепи ТКР, специфичного к клинически значимому МАГ ACC-1Y. К настоящему моменту известны последовательности высокоаффинных ТКР только двух МАГ — НА-1 и НА-2, презентуемых в контексте аллеля *HLA-A*02:01*, частота которого в российской популяции составляет около 25%. Для расширения

применимости МАГ-специфичной иммунотерапии крайне актуален поиск высокоаффинных рецепторов, распознающих МАГ, презентуемые в других частых аллелях *HLA*. По существующим оценкам панель из 50 терапевтических минорных антигенов позволит проводить МАГ-специфичную иммунотерапию лейкозов у 35% всех реципиентов алло-ТГСК [20]. Используемый нами протокол применим для получения ТКР, специфичных к другим МАГ. Создание панели МАГ-специфичных ТКР важно для разработки протокола иммунотерапии рецидивов лейкозов.

Нами показано, что ACC-1Y-специфичные клетки можно получить путем инкубации наивных CD8⁺ лимфоцитов от ACC-1Y^{-/-}-донора с аутологичными ДК, нагруженными синтетическим антигеном. ACC-1Y-специфичные клетки детектировали

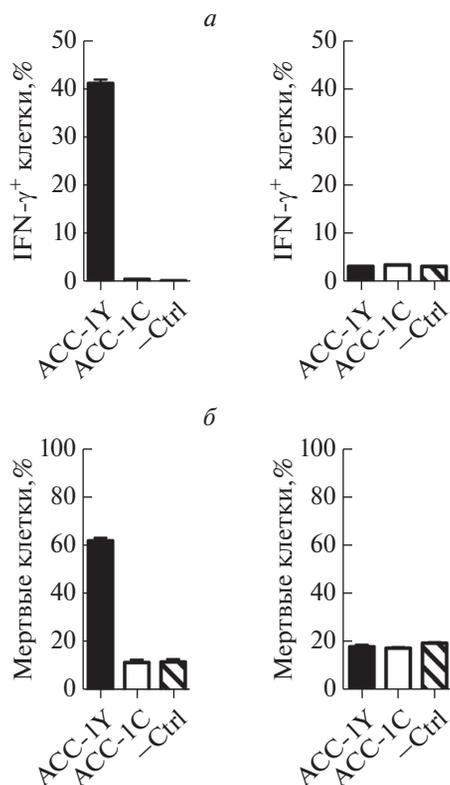


Рис. 2. Т-клетки после ACC-1Y-специфичной экспансии распознают и уничтожают только клетки, которые презентуют на своей поверхности пептид ACC-1Y, но не ACC-1C. *а* – Внутриклеточная продукция IFN- γ . *б* – Цитотоксичность лимфоцитов экспансии в отношении клеток-мишеней. Представлены данные для антигенспецифичной культуры ACC-1Y (слева) и культуры, изначально стимулированной пептидом ACC-1C (справа). В качестве клеток-мишеней использовали клетки аутологичной лимфобластоидной линии, нагруженные синтетическим пептидом ACC-1Y. В качестве контроля использовали лимфобластоидные клетки без пептида (–Ctrl) и нагруженные пептидом ACC-1C. На диаграмме изображено среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 3$.

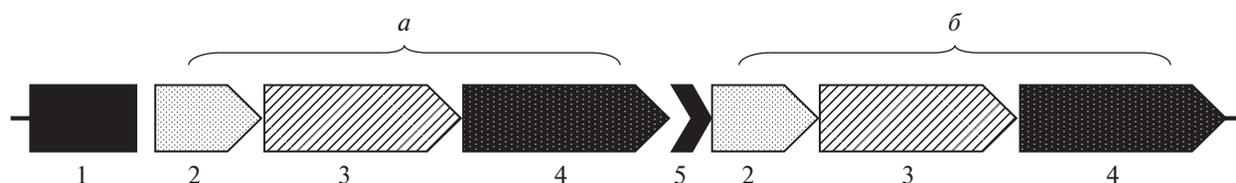


Рис. 3. Схема лентивирусной конструкции. Экспрессия трансгенного ТКР контролируется цитомегаловирусным промотором (1). ТКР состоит из полных α - (*а*) и β -цепей (*б*), разделенных пептидом 2A (5). Каждая цепь состоит из лидерного пептида (2), варибельной области (3) и константного участка (4).

и выделяли с помощью связывания с полученными в ходе работы тетрамерами ACC-1Y-HLA-A*24:02. Выявлена также ACC-1Y-специфичная продукция IFN- γ культурой Т-лимфоцитов после экспансии, а также их цитотоксическая активность в отношении клеток-мишеней.

Определена нуклеотидная последовательность, кодирующая ТКР, специфичного к МАГ ACC-1Y, и создана генетическая конструкция для бицистронной экспрессии генов α - и β -цепей ТКР, которую клонировали в лентивирусный вектор.

Полученная с помощью трансдукции культура Т-лимфоцитов была функционально активной и специфичной к антигену ACC-1Y.

Описанный нами подход может использоваться при получении генетически модифицированных лимфоцитов, применяемых в посттрансплантационной иммунотерапии. Однако для его внедрения в клиническую практику необходимо преодолеть ряд технических ограничений. Известно, что α - и β -цепи трансгенных ТКР способны рекомбинировать с цепями эндогенного ТКР, что теоретически может

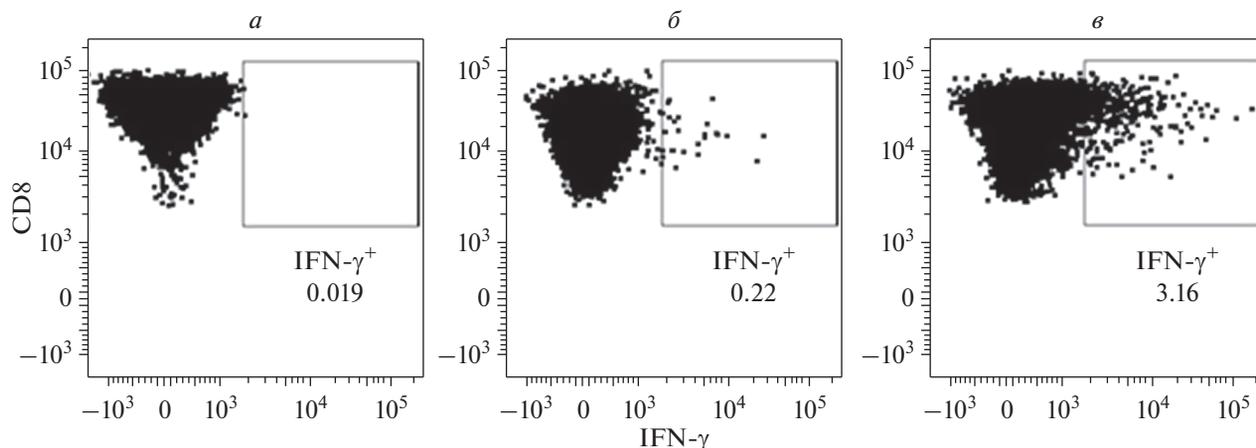


Рис. 4. Трансдуцированные Т-клетки секретируют IFN- γ в ответ на антигенную стимуляцию. Внеклеточная окраска на IFN- γ . *a* – Неокрашенный контроль. *б* – Клетки трансдуцированной культуры, инкубированные с B-LCL без пептида. *в* – с B-LCL, нагруженными пептидом ACC1-Y.

привести к возникновению ТКР с новой специфичностью [21]. Нокаут эндогенных цепей ТКР с помощью системы CRISPR/Cas9 не только позволит избежать нежелательной рекомбинации, но также увеличит их цитотоксическую активность, как показано на мышах [22].

Кроме того, эффективность даже оптимизированной вирусной трансдукции не достигает 100%, поэтому при экспансии модифицированной культуры пролиферируют также лимфоциты, содержащие нативные рецепторы с неизвестными специфичностями. Трансфузия смешанной культуры может привести к возникновению аллореактивного иммунного ответа. В связи с этим необходим метод селекции модифицированных клеток. Одним из возможных подходов может быть селекция антигенспецифичных Т-лимфоцитов за счет их связывания с МНС-тетрамерами. Альтернативный метод заключается в модификации клеток поверхностным маркером, к которому существуют магнитно-меченные антитела, пригодные для клинического использования. Таким маркером может быть, к примеру, CD34, лишенный двух внутриклеточных доменов [11].

Эти подходы будут применены нами в дальнейшей работе по созданию генетически модифицированных лимфоцитов для посттрансплантационной иммунотерапии рецидивов лейкозов.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы благодарят Звягина Ивана Владимировича за помощь в секвенировании Т-рецептора.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barrett A.J., Battiwalla M. (2010) Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert. Rev. Hematol.* 3(4), 429–441.
2. Goulmy E.L.S., Schipper R., Pool J., Blokland E., Falkenburg F., Vossen J., Gratwohl A., Vogelsang G.B., van Houwelingen H.C., Van Rood J.J. (1996) Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 334(5), 281–285.
3. Wallny H.J., Rammensee H.G. (1990) Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature.* 343(6255), 275.
4. Ефимов Г.А., Вдовин А.С., Григорьев А.А., Филькин С.Ю., Быкова Н.А., Савченко В.Г. (2015) Иммунобиология острой реакции “трансплантат против хозяина”. *Мед. иммунология.* 17(6), 499–516.
5. Heemskerck M.H., Hoogeboom M., Hagedoorn R., Kester M.G., Willemze R., Falkenburg J.F. (2004) Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J. Exp. Med.* 199(7), 885–894.
6. Granados D.P., Rodenbrock A., Laverdure J.P., Côté C., Caron-Lizotte O., Carli C., Pearson H., Janelle V., Durette C., Bonneil E., Roy D.C., Delisle J-S., Lemieux S., Thibault P. (2016) Proteogenomic-based discovery of minor histocompatibility antigens with suitable features for immunotherapy of hematologic cancers. *Leukemia.* 30(6), 1344.

7. Bykova N.A., Malko D.B., Efimov, G.A. (2018) *In silico* analysis of minor histocompatibility antigen landscape based on 1000 Genomes project. *Front. Immunol.* **9**, 1819.
8. Nishida T., Akatsuka Y., Morishima Y., Hamajima N., Tsujimura K., Kuzushima K., Kodera Y., Takahashi T. (2004) Clinical relevance of a newly identified HLA-A*24:02-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br. J. Haematol.* **124**(5), 629–635.
9. Warren E.H., Fujii N., Akatsuka Y., Chaney C.N., Mito J.K., Loeb K.R., Gooley T.A., Brown M.L., Koo K.K.W., Rosinski K.V., Ogawa S., Matsubara A., Appelbaum F.R., Riddell S.R. (2010) Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplant with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood.* **115**(19), 3869–3878.
10. Вдовин А.С., Быкова Н.А., Ефимов Г.А. (2017). Т-лимфоциты с модифицированной специфичностью в терапии злокачественных заболеваний. *Молекуляр. биология.* **51**(6), 1008–1023.
11. Dossa R.G., Cunningham T., Sommermeyer D., Medina-Rodriguez I., Biernacki M.A., Foster K., Bleakley M. (2018) Development of T-cell immunotherapy for hematopoietic stem cell transplantation recipients at risk of leukemia relapse. *Blood.* **131**(1), 108–120.
12. White M., Whittaker R., Gandara C., Stoll E.A. (2017) A guide to approaching regulatory considerations for lentiviral-mediated gene therapies. *Hum. Gene Ther. Methods.* **28**(4), 163–176.
13. Romaniuk D., Postovskaya A., Khmelevskaya A., Malko D., Efimov G.A. (2018) Rapid multiplex genotyping of 20 HLA-A*02:01 restricted minor histocompatibility antigens. *Front. Immunol.* (В печати)
14. Wölfel M., Greenberg P.D. (2014) Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8⁺ T cells. *Nat. Protoc.* **9**(4), 950.
15. Вдовин А.С., Филькин С.Ю., Ефимова П.Р., Шитиков С.А., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Егоров Е.С., Хамаганова Е.Г., Дроков М.Ю., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Ефимов Г.А., Савченко В.Г. (2016) Применение рекомбинантных МНС-тетрамеров для изоляции вирусспецифичных CD8⁺ клеток здоровых доноров: потенциальный подход к клеточной терапии посттрансплантационной цитомегаловирусной инфекции. *Биохимия.* **81**(11), 1628–1642.
16. Toebes M., Rodenko B., Ovaas H., Schumacher T.N. (2009). Generation of peptide MHC class I monomers and multimers through ligand exchange. *Curr. Protoc. Immunol.* **87**(1), 18–16.
17. Mamedov I.Z., Britanova O.V., Zvyagin I.V., Turchaninova M.A., Bolotin D.A., Putintseva E.V., Lebedev Y.B., Chudakov D.M. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front. Immunol.* **4**, 456.
18. Donnelly M.L., Luke G., Mehrotra A., Li X., Hughes L.E., Gani D., Ryan M.D. (2001) Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ‘cleavage’ mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal ‘skip’. *J. Gen. Virol.* **82**(5), 1013–1025.
19. Janelle V., Carli C., Taillefer J., Orio J., Delisle J.S. (2015) Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J. Transl. Med.* **13**(1), 123.
20. Oostvogels R., Lokhorst H.M., Mutis T. (2016) Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives. *Bone Marrow Transplant.* **51**(2), 163.
21. van Loenen M.M., de Boer R., Amir A.L., Hagedoorn R.S., Volbeda G.L., Willemze R., van Rood J.J., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H. (2010) Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**(24), 10972–10977.
22. Roth T.L., Puig-Saus C., Yu R., Shifrut E., Carnevale J., Li P.J., Hiatt J., Saco J., Krystofinski P., Li H., Tobin V., Nguyen D.N., Lee M.R., Putnam A.L., Ferris A.L., Chen J.W., Schickel J.-N., Pellerin L., Carmody D., Alkorta-Aranburu G., del Gaudio D., Matsumoto H., Morell M., Mao Y., Cho M., Quadros R.M., Gurusurthy C.B., Smith B., Haugwitz M., Hughes S.H., Weissman J.S., Schumann K., Esensten J.H., May A.P., Ashworth A., Kupfer G.M., Greeley S.A.W., Bacchetta R., Meffre E., Roncarolo M.G., Kevan N.R., Herold C., Ribas A., Leonetti M.D., Marson A. (2018). Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* **559**(7714), 405.

MODIFICATION OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTES WITH T CELL RECEPTOR SPECIFIC FOR MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN ACC-1Y

A. M. Pilunov^{1,2,*}, A. A. Kuchmiy¹, S. A. Sheetikov^{1,2}, S. Y. Filkin¹,
D. S. Romaniuk¹, F. N. Rosov², and G. A. Efimov^{1,2}

¹National Hematology Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125167 Russia

²Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: a.pilunov@gmail.com

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only curative therapy for hematopoietic malignancies. The graft-derived donor lymphocytes are capable of eliminating the residual recipient malignant cells in the course of allogeneic immune response thus decreasing the chances of the disease relapse. Immunologically foreign peptides of the recipient presented in the MHC molecules are able to elicit the immune response. These polymorphic peptides are known as Minor Histocompatibility Antigens (MiHAs).

MiHAs are derived from the nonsynonymous single nucleotide polymorphisms. Transfusion of T cells specific to MiHAs presented predominantly in the cells of hematopoietic origin will allow the targeted elimination of residual malignant clones avoiding the undesirable damage of the healthy tissues. To induce the immune response, the donor must be homozygous by the MiHA allele and the recipient must either be homozygous or heterozygous by the alternative MiHA allele. Under the optimal frequency of allelic variants, the therapeutic mismatch occurs in 25% of cases. Minor antigen ACC-1Y is derived from polymorphism in gene *BCL-2A1* and its therapeutic mismatch occurrence approaches the theoretical maximum. In addition, ACC-1Y is overexpressed in cells of various lymphomas and it is presented on allele *HLA-A*24:02* which is relatively frequent in the Russian population. Combination of these factors makes the minor antigen ACC-1Y a prospective target for immunotherapy. Transfusion of donor CD8⁺ lymphocytes modified with transgenic MiHA-specific TCR is one of the promising methods of posttransplant leukemia therapy and relapse prophylaxis. Here, we obtained a sequence of high-affinity ACC-1Y-specific TCR. We cloned this sequence into the lentiviral vector and obtained the assembled viral particles. Further, we transduced the lymphocyte culture and demonstrated its antigen-specific cytotoxic activity. CD8⁺ lymphocytes modified by the described method could be potentially transferred to recipients either simultaneously with alloHSCT or as a relapse therapy.

Keywords: leukemia, minor histocompatibility antigens, adoptive transfer, lymphocyte modification