

На правах рукописи



Кузнецова Мария Сергеевна

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *IN VITRO*-ГЕНЕРИРОВАННЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ,
СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭПИТОПАМ АНТИГЕНА HER2/NEU**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск-2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Хайдуков Сергей Валерьевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории углеводов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Миронова Надежда Львовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ), г. Томск.

Защита диссертации состоится «05» сентября 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук



Хантакова Ю. Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Хирургическое лечение, лучевая терапия и химиотерапия представляют собой три общепринятых метода лечения рака, которые позволяют эффективно элиминировать основную опухолевую массу за короткий срок, но не способны уничтожить все опухолевые клетки. Минимальная опухолевая нагрузка, сохраняющаяся после удаления основной части новообразования, лежит в основе существующей проблемы рецидивов опухолей и развития метастазов, приводящих к увеличению уровня смертности и инвалидизации среди онкологических пациентов [Tachtsidis et al., 2016]. Очевидной становится необходимость разработки новых подходов, направленных на уничтожение единичных опухолевых клеток, сохранившихся после удаления основной опухолевой массы.

Исследования последних лет подтверждают, что использование потенциала иммунной системы дает возможность эффективно уничтожать опухолевые клетки, несущие на своей поверхности опухолевые антигены. Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) представляют собой центральное звено противоопухолевого антиген-специфического иммунитета, в связи с чем являются объектом пристального внимания исследователей в области иммунотерапии рака и активно используются для адоптивного Т-клеточного переноса [Wolf et al., 2018]. Интерес к ЦТЛ как к клеточному препарату для адоптивного переноса объясняется способностью данных клеток к реализации механизмов цитотоксичности, к которым относится секреция интерферона- γ (IFN- γ), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), гранул перфорина и гранзима, а также FasL/TRAIL-опосредованный запуск клеточной гибели [Peters et al., 1991; Barry, Bleakly, 2002; Halle et al., 2017]. При этом в последние годы становится очевидным, что цитотоксичность эффекторных клеток не является исчерпывающим условием успешного устранения опухолевой нагрузки: эффективность Т-клеточной иммунотерапии также определяется способностью противоопухолевых клеток к длительному самоподдержанию в организме пациента. Показано, что уровень жизнеспособности и пролиферативной активности Т-клеток прямо коррелирует с противоопухолевой эффективностью адоптивной Т-клеточной терапии [Gattinoni et al., 2006; June, 2007; Hinrichs et al., 2009]. В связи с этим особую важность приобретает наличие Т-клеток памяти в популяциях противоопухолевых антиген-специфичных Т-лимфоцитов [Perret, Ronchese, 2008].

В научной литературе существует множество примеров использования аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами, для стимуляции иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток [Jeras et al., 2005; Boudreau et al., 2011; Курилин и др., 2013; Sennikov et al., 2016]. Традиционно после стимуляции дендритными клетками в качестве эффекторов против опухолевых клеток используется смешанная культура активированных моноклеарных клеток. Уровень цитотоксического действия на опухолевые клетки-мишени в такой культуре может быть снижен в связи с низким фактическим содержанием клеток-эффекторов, т.е. непосредственно CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов из-за присутствия большого количества клеток других типов и функций (включая супрессорные клетки) в смешанной культуре моноклеарных клеток. Возможность выхода из данной ситуации появилась с развитием методов специфического окрашивания и выделения антиген-специфичных Т-лимфоцитов МНС-мультимерами. Так, технология обратимого окрашивания CD8⁺ Т-лимфоцитов человека HLA-стрептамерами позволяет выделять специфичные к конкретным антигенам Т-клетки с последующим эффективным удалением реагентов окрашивания с поверхности лимфоцитов, не влияя при этом на их жизнеспособность и функции. Использование функционально полноценных антиген-специфичных Т-лимфоцитов, выделенных по технологии стрептамеров, в качестве эффекторной популяции против опухолевых клеток, несущих опухолевый антиген, может способствовать получению более мощного цитотоксического эффекта по сравнению с цитотоксичностью смешанной культуры активированных моноклеарных клеток.

Помимо повышения чистоты популяций цитотоксических Т-клеток, современные методы многоцветной проточной цитометрии в сочетании с технологиями МНС-мультимеров позволяют не только идентифицировать и выделять популяции ЦТЛ, но также вести фенотипическое исследование уровня дифференцировки, функциональных особенностей данных клеток, и даже исследовать распределение субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций, специфичных к конкретным эпитопам опухолевых антигенов.

Опухоль-ассоциированный антиген HER2/neu (Human Epidermal-growth-factor Receptor-2, HER2) входит в семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека

и обычно экспрессируется в процессе эмбриогенеза, но также присутствует на нормальных клетках органов взрослого организма [Gutierrez, Schiff, 2011; Wen, Hu, 2016]. Гиперэкспрессия HER2/neu, характерная для клеток различных видов злокачественных карцином, сделала его удобной мишенью для иммунотерапии. Для HER2/neu описан целый ряд иммуногенных эпитопов, способных инициировать выраженный специфический иммунный ответ, среди которых можно выделить, в частности, эпитопы E75 (HER2 369-377) и E88 (HER2 689-697), как наиболее эффективно представляемые в комплексе с молекулами HLA-A*0201 – аллелем, HLA класса I, встречающимся в наибольшем количестве изученных человеческих популяций, а также характеризующимся наибольшей встречаемостью в европеоидной популяции [Middleton et al., 2000]. При этом в подавляющем большинстве опубликованных клинических испытаний используется пептид HER2/neu HER2 369-377 [Correa, Plunkett, 2001; Bernhard et al., 2008].

Основной локализацией HER2-гиперэкспрессирующих опухолей является молочная железа. Рак молочной железы остается ведущей онкопатологией у женского населения России на протяжении многих лет (21,1%), уровень смертности от которого занимает первое место (16,4%) [под ред. Каприна и др., 2018]. На сегодняшний день разработан и применяется в клинической практике ряд антител и лекарственных препаратов, направленных на остановку пролиферативной активности клеток HER2-позитивных опухолей [Rongcun et al., 1999; Goebel et al., 2002; Bernhard et al., 2008; English et al., 2013; Maksyutov et al., 2014; Eroglu et al., 2014]. Однако, несмотря на успешность многих подходов, экспрессия HER2/neu продолжает быть ассоциирована с наиболее агрессивным течением заболевания, плохим клиническим прогнозом и ухудшением показателей выживаемости [Subbiah, Gonzalez-Angulo, 2013]. Поэтому исследования, связанные с HER2/neu, не теряют своей актуальности [Grela-Wojewoda et al., 2015; Ahmed et al., 2015; Wen, Hu, 2016; Jiao et al., 2018].

Таким образом, разработка подхода, сочетающего получение, выделение и наработку функционально активных цитотоксических Т-лимфоцитов с последующим адаптивным переносом данных клеток, позволит решить проблему остаточной опухолевой нагрузки у пациентов с HER2-позитивными опухолями и высоким риском развития рецидивов.

Цель работы

Целью настоящей работы является получение популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 белка HER2 и оценка их противоопухолевой активности и субпопуляционного состава.

Задачи

1. Оценить содержание E75 и E88-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.
2. Разработать протокол получения *in vitro* антиген-специфичных Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации.
3. Изучить цитотоксический эффект двух клонов Т-лимфоцитов, специфичных к разным эпитопам белка HER2 против опухолевых клеток *in vitro*.
4. Исследовать содержание Т-клеток памяти в популяциях E75- и E88-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов.

Научная новизна работы

Разработан протокол получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей иммуногенные эпитопы E75 и E88 белка HER2, магнитной сепарации HER2-специфичных ЦТЛ и наработки выделенных ЦТЛ с помощью цитокинов IL-2, IL-7, IL-15.

Показано наличие HER2-специфичных Т-лимфоцитов в крови условно-здоровых доноров и значимое большее их содержание в крови пациентов с HER2-гиперэкспрессирующим раком молочной железы в анамнезе.

Впервые проведено фенотипическое исследование эффекторных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти в популяциях HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, включая определение таких субпопуляций как наивные Т-лимфоциты, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток и терминально-дифференцированные Т-лимфоциты. Продемонстрировано, что полученные

Е75- и Е88-специфичные ЦТЛ более чем на 40% представлены Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток и способны к более выраженному цитотоксическому ответу и повышенной продукции IFN- γ в ответ на совместное культивирование с HER2-экспрессирующими опухолевыми клетками, по сравнению с показателями цитотоксичности и продукции IFN- γ смешанной культуры активированных моноклеарных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты указывают на то, что активация Т-клеток дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2, и последующие выделение и стимуляция CD8⁺ HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов цитокинами IL-2, IL-7 и IL-15 приводит к формированию клеток, в значительной степени представленных фенотипом клеток памяти, и прежде всего — Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток. Полученные клетки проявляют выраженную цитотоксичность против HER2-экспрессирующих опухолевых клеток и продуцируют большее количество IFN- γ в ответ на совместное культивирование с клетками-мишенями. Результаты исследования продукции IFN- γ свидетельствуют о том, что продукция IFN- γ имеет место при неспецифическом Т-клеточном иммунном ответе, однако уровень продукции IFN- γ существенно выше у CD8⁺ Т-клеток, реализующих антиген-специфическую цитотоксическую функцию.

Установленные данные о распределении субпопуляций Т-клеток памяти в популяциях CD8⁺ Т-клеток и в популяциях антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов позволяют дополнить современное представление о содержании и соотношении циркулирующих CD8⁺ Т-клеток памяти периферической крови. Подобранными нами восьмицветная панель антител для проточной цитометрии, включающая антитела к человеческим CD8, CD45RA, CD62L, CD27, CD28, CD127, CD95 и HLA-стрептамеры, может быть использована для фенотипирования всех основных субпопуляций циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти как в общем лимфоцитарном пуле, так и в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов конкретной антигенной специфичности.

Полученные данные о различиях в содержании HER2-специфичных ЦТЛ у здоровых доноров и пациентов указывают на наличие HER2-специфичного иммунного ответа при HER2-позитивном раке молочной железы.

Практическая значимость исследования связана с разработкой протокола получения популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, который может лечь в основу клеточной технологии для осуществления адоптивного Т-клеточного переноса пациентам с HER2-позитивным раком молочной железы и других сопряженных с гиперэкспрессией HER2 локализаций рака. В частности, основанная на предложенном способе Т-клеточная иммунотерапия может быть эффективна для элиминирования HER2-экспрессирующих опухолевых клеток после удаления основной опухолевой нагрузки, для предотвращения рецидивов и метастазирования. На основании результатов проведенного исследования получен патент №2619186 на изобретение «Способ получения *in vitro* популяций активированных антиген-специфичных противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Стимуляция культуры моноклеарных клеток периферической крови аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы Е75 и Е88 белка HER2/neu, повышает содержание Е75-специфичных и Е88-специфичных Т-лимфоцитов и уровень их цитотоксичности против линии HER2-экспрессирующих опухолевых клеток.

2. Е75- и Е88-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты, активированные аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы Е75 и Е88 белка HER2, характеризуются низким содержанием наивных Т-лимфоцитов и высоким содержанием Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Семинарах отдела экспериментальной иммунологии НИИФКИ (Новосибирск, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018 гг.).
2. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (2015, 2016, 2017, 2018 гг.).

3. IX отчетной научной сессии НИИФКИ (Новосибирск, 2016 г.).
4. 52-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2014 (Новосибирск, 2014 г.).
5. 18-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пушино, 2014 г.).
6. VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2015 г.).
7. 15 Международном Симпозиуме по Дендритным Клеткам (15th International Symposium on Dendritic Cells) (Ахен, Германия, 2018 г.).
8. 5 Европейском конгрессе по иммунологии (5th European Congress of Immunology — ECI) Амстердам, Нидерланды, 2018 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК. Получен 1 патент.

Личный вклад автора в проведение исследования

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 195 источников, из них 178 зарубежных. Работа иллюстрирована 23 рисунками, 4 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) HLA-A*02-позитивных условно-здоровых доноров (18 человек; 12 женщин и 6 мужчин, медиана возраста – 42 года) и пациентов с подтвержденным диагнозом HER2-позитивного рака молочной железы (РМЖ), проходивших лечение в онкологическом отделении №3 МБУЗ ГКБ №1 города Новосибирска (12 человек).

По результатам HLA генотипирования образцов ДНК, выделенных из МНК ПК 12 пациентов с HER2-позитивным РМЖ, МНК ПК четверых пациентов обнаружили аллель HLA-A*02 и были отобраны для участия в исследовании.

Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех доноров и пациентов, одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол №111 от 6.11.2018). МНК ПК пациентов были использованы в настоящем исследовании в качестве группы сравнения для оценки относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к исследуемым эпитопам опухоли-ассоциированного антигена HER2/neu, в лимфоцитарном пуле МНК ПК условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным РМЖ в анамнезе.

Генотипирование для выявления аллеля HLA-A*02

Генотипирование по локусу A HLA проводилось на начальных этапах исследования для отбора доноров и пациентов, позитивных по экспрессии HLA A*02, а также для подбора HLA A*02⁺ опухолевой клеточной линии человека, экспрессирующей антиген HER2/neu, методом амплификации участков генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческого набора для HLA генотипирования низкого разрешения по локусу A «ALLSET™ GOLD HLA A LOW RES SSP» по протоколу изготовителя. Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК производилась с помощью гель-электрофореза на 2% агарозном геле.

Получение зрелых дендритных клеток, нагруженных антигеном

Незрелые дендритные клетки (ДК) получали путем культивирования прилипающей фракции МНК ПК условно-здоровых доноров, полученной с помощью инкубации на МНК ПК на пластике в течение 30 минут. Для культивирования МНК ПК и ДК использовалась среда RPMI-1640, дополненная 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 5×10⁻⁵ mM меркаптоэтанол, 25 mM HEPES, 80 мкг/мл гентамицина и 100 мкг/мл ампициллина (далее — среда для культивирования, культуральная среда). Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови проводилось по стандартной методике [Boyum, 1968] на градиенте плотности фиколла-урографина.

Для нагрузки дендритных клеток опухоль-ассоциированным антигеном HER2/neu использовался метод нуклеофекции незрелых дендритных клеток на приборе Nucleofector 2b (Lonza, Швейцария), с использованием коммерческого набора Amaxa Human Dendritic Cell Nucleofector Kit и ДНК-конструкции рMax-2ериторе, кодирующей эпитопы E75 и E88 антигена HER2/neu (плазмида HER2). Нуклеофекция проводилась согласно протоколу производителя. После завершения процедуры антигенной нагрузки трансфицированные ДК культивировались в культуральной среде с добавлением 25 нг/мл TNF α (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в концентрации 1×10^6 /мл в культуральных флаконах с поверхностью роста 25 см² в течение 48 часов для стимуляции созревания трансфицированных ДК.

Фенотипирование ДК и оценка их функциональной активности

Оценку фенотипа ДК проводили методом проточной цитометрии на приборе BD FACSAria (Becton Dickinson, США), с использованием соответствующих моноклональных антител, специфичных к человеческим маркерам CD3, CD14, HLA-DR, CD11c, CD209, CD86, CD83, согласно инструкциям изготовителя.

В качестве критерия функциональной активности ДК оценивали их способность к рецептор-опосредованному эндоцитозу FITC-декстрана методом проточной цитометрии.

Получение и анализ HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Для получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов культуру МНК ПК, истощенную по моноцитарной фракции (неприлипающие МНК), культивировали со зрелыми дендритными клетками, трансфицированными плазмидой HER2 или контрольной плазмидой, не кодирующей иммуногенных эпитопов (плазмида р5). Совместное культивирование в культуральных флаконах проводилось в соотношении МНК : ДК, равном 10 : 1 и конечной концентрации 1 млн/мл, в среде для культивирования, в течение 5 суток с заменой половины объема среды для культивирования на 3 сутки.

Для выявления популяции HER2-специфичных Т-лимфоцитов в совместной культуре МНК и ДК клетки на 5 сутки совместного культивирования окрашивались комплексом для окрашивания антиген-специфичных Т-клеток по технологии Streptamer (Iba, Германия) путем инкубирования культур с окрашивающими комплексами (далее – стрептамеры) в течение 45 минут при температуре +4 °С, после чего окрашенные пробы дополнительно метились следующими антителами для фенотипирования цитотоксических Т-клеток: CD8-Brilliant-Violet-510, CD28-FITC, CD27-PerCP, CD95-PE-Cy7, CD127-APC, CD62L-APC-Cy7, CD45RA-Pacific-Blue.

Изоляция и наработка HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Выделение HER2-специфичных Т-лимфоцитов производилось методом магнитной сортировки на колонках MS Columns. Для мечения HER2-специфичных Т-лимфоцитов использовались магнитные частицы Strep-Tactin Nano Beads, а также реагенты МНС I-Strep HLA-A*0201 KIFGSLAFL, МНС I-Strep HLA-A*0201 RLLQETELV, раствор IS buffer, D-Biotin. Для эффективной наработки количества выделенных HER2-специфичных Т-лимфоцитов, необходимого для использования в дальнейших экспериментах, был поставлен эксперимент по подбору оптимальных концентраций цитокинов, необходимых для стимуляции пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Производилось титрование концентраций цитокинов по пролиферации CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, предварительно меченных флуоресцентным витальным красителем CFSE. По результатам были выбраны оптимальные сочетание и концентрация цитокинов: целевую фракцию клеток после магнитной сортировки культивировали в 96-луночном планшете в концентрации 1 млн/мл в среде для культивирования, в присутствии цитокинов rhIL-7 (50 нг/мл), rhIL-15 (50 нг/мл) и rhIL-2 (50 нг/мл) в течение 10-14 суток, с заменой половины объема среды и повторным добавлением цитокинов через каждые 3-4 суток. Через 14 суток культивирования выделенных клеток был произведен анализ содержания клеток, несущих поверхностный маркер CD8, путем мечения клеток антителами anti-human CD8-APC и анализа на проточном цитометре BD FACSVersе.

Оценка экспрессии гена *ErbB2* в клетках опухолевой линии MCF-7

По результатам оценки наличия аллеля HLA-A*02 у клеточных линий-кандидатов на роль клеток-мишеней, для оценки прямой цитотоксичности HER2-специфичных Т-лимфоцитов была выбрана клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (Банк клеточных культур ИИЦ РАН, Россия). Наличие экспрессии гена *ErbB2* в клетках линии MCF-7 определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с помощью набора БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2 \times) (ООО «Биолабмикс», Россия). Набор предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

одношаговым методом. Для этого из клеток линии MCF-7 двух разных пассажей была выделена суммарная клеточная РНК методом фенольной экстракции (Chomczynski, Sacchi, 1987). Для реакции использовали праймеры для синтеза *ErbB2*: прямой 5'-GGGAAGAATGGGGTCGTCAAA-3', обратный 5'-CTCCTCCCTGGGGTGTCAAGT-3' [Ariazi et al., 2002; Lu et al., 2011; Jung et al., 2014]. Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК для обнаружения искомого продукта производилась с помощью геле-электрофореза на 1,5% агарозном геле.

Анализ эффекторных свойств HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов

Оценка прямой цитотоксичности полученных культур HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов осуществлялась с помощью метода проточной цитометрии по следующему протоколу. Клетки линии MCF-7, прижизненно меченные CFSE, совместно культивировали в 96-луночном круглодонном планшете с культурами E75- и E88-специфичных Т-лимфоцитов, соответственно, в соотношении 1:10, в течение 48 часов, после чего метились йодидом пропидия (PI) и анализировались на BD FACSVerse.

Для подсчета процента цитотоксичности мы использовали следующую формулу:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \% \text{ PI}^+ \text{CFSE}^+ \text{ MCF-7}_{(\text{effector}+\text{target})} - \% \text{ PI}^+ \text{CFSE}^+ \text{ MCF-7}_{(\text{target})},$$

где $\% \text{ PI}^+ \text{CFSE}^+ \text{ MCF-7}_{(\text{effector}+\text{target})}$ – процент поврежденных клеток линии MCF-7 от общего числа клеток данной линии в пробе совместной культуры клеток-эффекторов и клеток-мишеней,

а $\% \text{ PI}^+ \text{CFSE}^+ \text{ MCF-7}_{(\text{target})}$ – процент спонтанной гибели клеток-мишеней.

Продукция IFN- γ исследуемыми клетками в ответ на предъявление клеток-мишеней MCF-7 оценивалась в кондиционных средах с помощью коммерческой тест-системы «гамма-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ» согласно протоколу производителя. Кондиционные среды были собраны через 48 часов совместного культивирования E75- и E88-специфичных клеток с клетками линии MCF-7.

Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Оценка значимости отличий между исследуемыми группами производилась с использованием непараметрических статистических критериев. Сравнение независимых выборок с определением статистической значимости отличий проводилось с использованием критерия Манна-Уитни и непараметрического дисперсионного рангового критерия Краскела-Уоллиса с множественным сравнением медиан. Статистическая значимость изменений в зависимых выборках устанавливалась с помощью критерия Вилкоксона. Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$, уровни значимости отличий указаны в пояснениях к иллюстрациям.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка содержания HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов в крови здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным РМЖ

Для того, чтобы оценить начальный уровень содержания клонов ЦТЛ, специфичных к эпитопам антигена HER2/neu, в крови условно-здоровых доноров, а так же с целью оценить, имеются ли отличия в содержании HER2-специфичных цитотоксических Т-клеток у здоровых людей и больных HER2-позитивным раком молочной железы, мы провели цитометрическое исследование содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu, в лимфоцитарном пуле моноклеарных клеток периферической крови HLA-A*02-позитивных условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным РМЖ в анамнезе (**рисунок 1**). Woll M.M. и соавторы ранее показали, что относительное количество CD8⁺ Т-клеток, специфичных к эпитопу E75 белка HER2/neu, составляет порядка 0,2-0,3% от общего пула лимфоцитов периферической крови пациентов с HER2-позитивным РМЖ [Woll et al., 2004], что согласуется с полученными в настоящем исследовании результатами. Однако прежде оставалось неясным, являются ли значения порядка 0,2% в крови пациентов результатом развития специфического клеточного ответа на гиперэкспрессию антигена HER2/neu в организме, или же они указывают на отсутствие клональной экспансии HER2-специфичных ЦТЛ, не превышая значения содержания данных клеток в крови здоровых людей. Результаты сравнения пациентов и здоровых доноров, таким образом, позволили прояснить, что увеличение клонов ЦТЛ, специфичных к эпитопам HER2/neu, имеет место в организме пациентов.

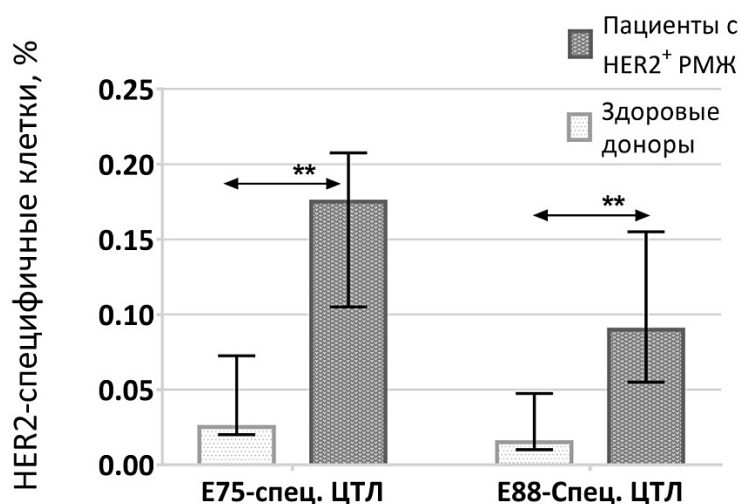


Рисунок 1 — Относительное содержание CD8⁺HER2-специфичных лимфоцитов в МНК ПК здоровых доноров (n = 8) и пациентов с HER2⁺ РМЖ (n = 4). Медиана и межквартильный интервал. Стрелками обозначены статистически значимые различия, $p \leq 0.05$.

Разработка протокола получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Важной задачей, необходимой для достижения цели исследования, стала разработка протокола получения антиген-специфичных Т-лимфоцитов с использованием аутологичных дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации, с оптимизацией всех этапов протокола.

Оптимизация метода выделения прилипающей фракции мононуклеарных клеток

На этапе выделения моноцитов из общей фракции МНК ПК условно-здоровых доноров, с целью увеличения эффективности данной процедуры мы провели сравнительный анализ протоколов выделения моноцитов адгезией на пластике, предполагающих использование различных временных режимов и вариантов обработки пластика. Рассматривалось 6 вариаций метода: прилипающую фракцию клеток получали, соответственно, посредством культивирования на пластике, обработанном BSA в течение 30, 60 и 120 минут, а также посредством культивирования на пластике без дополнительной обработки в течение 30, 60 и 120 минут. Результаты цитометрического анализа полученных культур представлены ниже на **рисунке 2**. Для дальнейшего использования в исследовании был выбран протокол инкубации клеток без дополнительной обработки пластика в течение 30 минут, поскольку культивирование при данных параметрах привело к достижению наибольшего содержания CD14⁺ клеток во фракции прилипающих МНК.

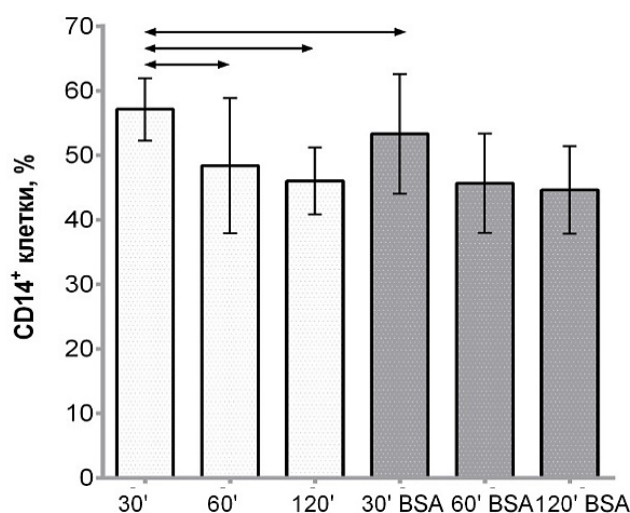


Рисунок 2 — Содержание CD14⁺ клеток в популяции моноцитов культур клеток МНК ПК условно-здоровых доноров после адгезии на пластике с обработкой BSA и без неё (n = 12). Среднее и стандартная ошибка среднего. $p \leq 0.05$.

Подбор способа доставки ДНК-плазмиды в дендритные клетки

Для определения оптимального способа доставки ДНК-конструкции, кодирующей эпитопы антиген-ассоциированного антигена, в дендритные клетки, был проведен эксперимент по сравнению методов магнитной трансфекции и нуклеофекции дендритных клеток условно-здоровых доноров. В качестве ДНК-конструкции для обоих видов трансфекции использовали плазмиду рMaxGFP, кодирующую флуоресцентный белок GFP. Эффективность трансфекции оценивалась посредством анализа относительного количества клеток, экспрессирующих белок GFP, через 12 часов после трансфекции, на проточном цитометре. В результате относительное количество ДК, экспрессирующих GFP, в образцах клеток, трансфицированных методом нуклеофекции, значительно превысило таковое в образцах, трансфицированных с помощью магнитной трансфекции (41,75% против 31,50%, соответственно, $p = 0.0173$). Таким образом, далее для антигенной нагрузки ДК в работе использовался метод нуклеофекции клеток.

Оценка фенотипа и функциональной активности полученных ДК

Изменения фенотипа в ряду «прилипающие МНК — незрелые ДК — зрелые ДК», проявляющееся в изменении количества клеток, экспрессирующих маркеры CD14, CD86, HLA-DR, CD11c (рисунк 3), свидетельствует о дифференцировке моноцитов прилипающей фракции в дендритные клетки под действием цитокинов, последовательном приобретении более зрелого фенотипа дендритными клетками, усилении антиген-презентирующей функции.

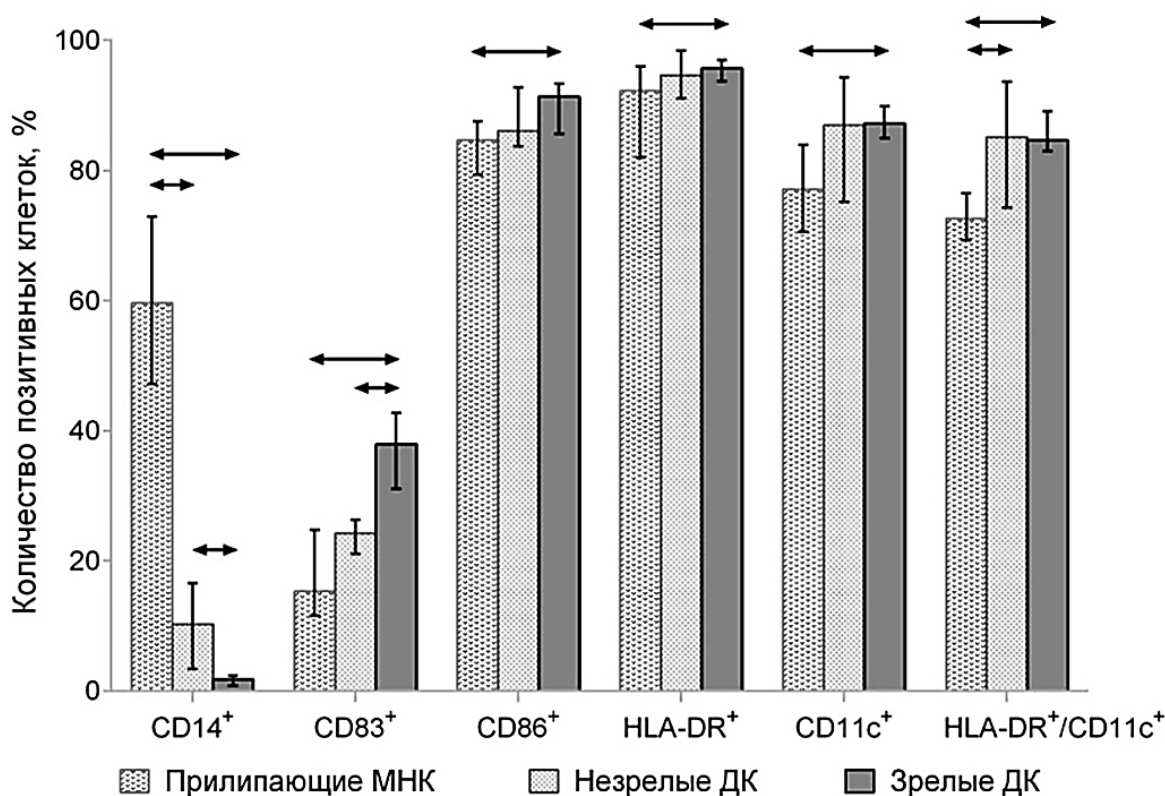


Рисунок 3 — Относительное количество клеток, экспрессирующих маркеры дендритных клеток и маркер CD14 ($n = 12$). Медиана и межквартильный интервал. $p \leq 0.05$.

Установлено также, что клетки фракции зрелых ДК обладают значительно меньшей активностью в захвате антигена, чем клетки фракции незрелых ДК (рисунк 4), что подтверждает созревание дендритных клеток, поскольку только незрелые ДК способны к эффективному захвату антигена по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза.

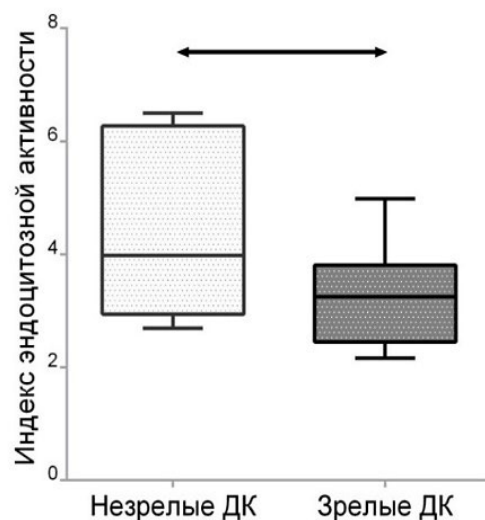


Рисунок 4 — Эндоцитозная активность ДК в зависимости от степени их зрелости (n = 12). Исследуемые ДК получены из моноцитов периферической крови здоровых доноров. Медиана, межквартильный интервал, минимум и максимум значений. $p < 0.05$.

Таким образом, нами было показано, что в ходе использования протоколов получения незрелых и зрелых ДК под действием цитокинов моноциты условно-здоровых доноров дифференцируются в зрелые дендритные клетки.

Оценка содержания HER2-специфичных Т-лимфоцитов в совместной культуре моноклеарных клеток и нагруженных антигеном дендритных клеток

Результаты оценки содержания HER2-специфичных ЦТЛ в совместной культуре МНК и ДК, нагруженных антигеном, приведенные на **рисунке 5**, подтверждают, что увеличение содержания HER2-специфичных Т-лимфоцитов в опытных пробах связано непосредственно с активацией лимфоцитов дендритными клетками, трансфицированными плазмидой HER2, и не связана с неспецифической активацией Т-клеток дендритными клетками, трансфицированными контрольной плазмидой, или с неспецифической активацией любыми другими типами антиген-презентирующих клеток, которые могли присутствовать в исследуемых культурах.

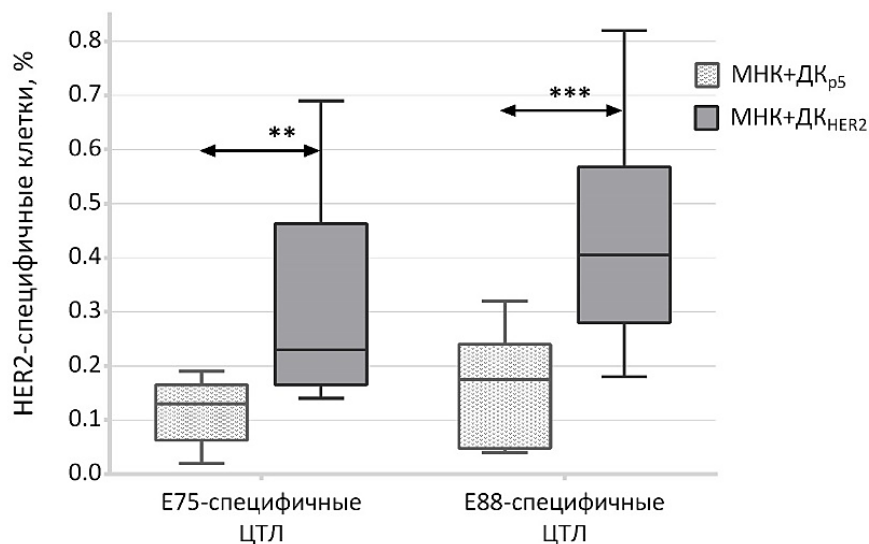


Рисунок 5 — Относительное содержание HER2-специфичных лимфоцитов в совместных культурах МНК и ДК (n = 12). Медиана, межквартильный интервал, минимум и максимум. ** — $p < 0.01$, * — $p < 0.001$.**

Оценка эффективности получения популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu

Чистые популяции HER2-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов получали из совместных культур МНК+ДК_{HER2} путем выделения клеток, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu, методом магнитной сортировки. Эффективность магнитной сортировки оценивалась анализом содержания CD8⁺ Т-

клеток в отсортированных культурах. Анализ клеток от 8 доноров показал содержание CD8⁺ клеток, составляющее в среднем 71,5% в культуре E88-специфичных Т-лимфоцитов и 90,2% в культуре E75-специфичных Т-лимфоцитов, соответственно. На **рисунке 6** представлены типичные результаты проточной цитометрии контрольной и опытной проб.

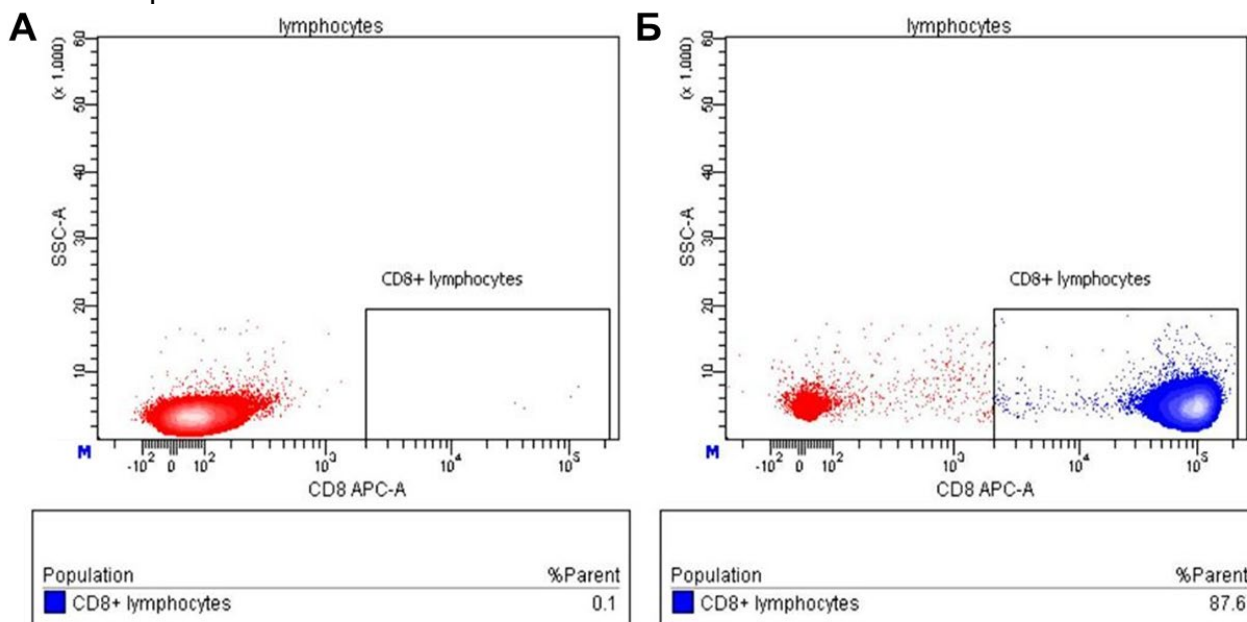


Рисунок 6 — Оценка относительного содержания CD8⁺ клеток в 14-дневной культуре HER2-специфичных Т-лимфоцитов, выделенных методом магнитной сортировки.

Примечание: А — точечная диаграмма распределения событий лимфоцитарного гейта контрольной пробы (не меченные клетки); Б — точечная диаграмма распределения событий лимфоцитарного гейта опытной пробы (14-дневная культура клеток, отсортированных по эпитопу E88, меченных антителами anti-CD8-APC).

Об эффективности проведения магнитной сепарации, таким образом, можно судить по выявленному высокому содержанию клеток, несущих на своей поверхности маркер CD8. В пользу чистоты полученной популяции также говорит тот факт, что в опытной пробе антиген-специфичных клеток не обнаруживались клетки моноцитарного пула (по показателям прямого и бокового светорассеивания), а также клетки иной морфологии, кроме клеток лимфоцитарного пула. Кроме того, сама процедура магнитной сортировки по технологии Streptamer основана на взаимодействии магнитных бус, конъюгированных с молекулами МНС I класса, несущими целевые антигенные эпитопы, с антиген-специфичными Т-клеточными рецепторами Т-лимфоцитов. Приведенные данные, таким образом, позволяют утверждать, что выделенная популяция действительно представляет собой CD8⁺ HER2-специфичные Т-лимфоциты.

Обогащение культуры отсортированных HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Для подбора оптимальных условий для обогащения культуры отсортированных Т-лимфоцитов был проведен эксперимент по титрованию концентраций цитокинов rhIL-2, rhIL-7 и rhIL-15 в различных комбинациях, поскольку именно эти цитокины по данным научной литературы являются наиболее важными стимуляторными факторами для пролиферации и поддержания жизнеспособности CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и CD8⁺ Т-клеток памяти. Определение наиболее подходящих комбинации и концентраций стимуляторных молекул осуществлялось посредством оценки пролиферативной активности CD8⁺ клеток в общей культуре МНК периферической крови условно-здоровых доноров.

В результате проведенного эксперимента была выбрана комбинация из всех трех исследуемых цитокинов, где концентрация каждого стимулятора составила 50 нг/мл (**рисунк 7**).

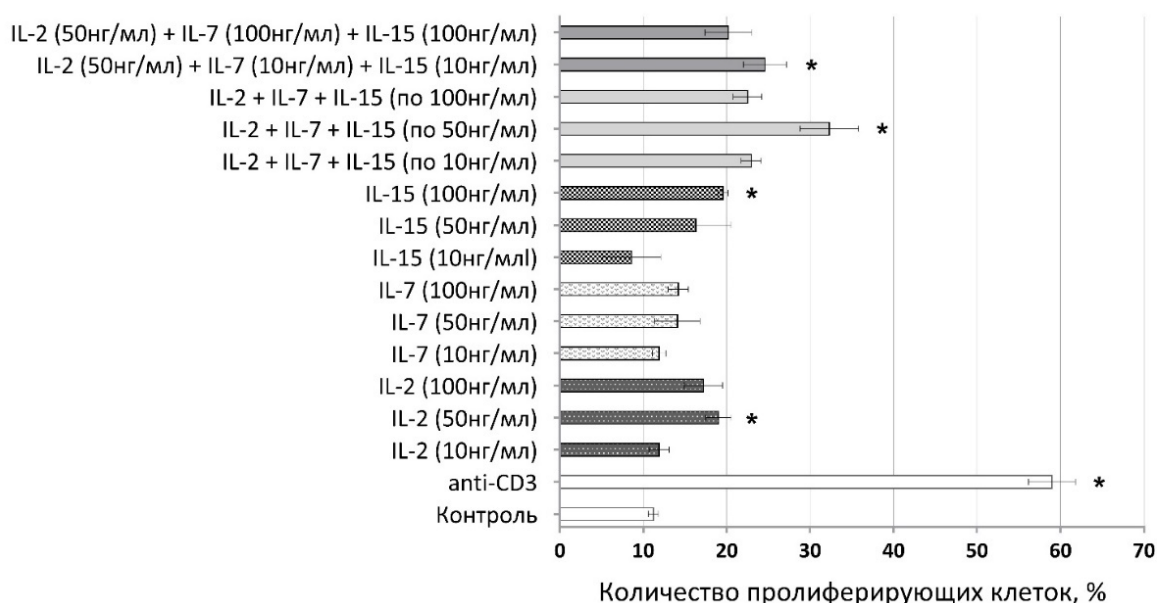


Рисунок 7 — Пролиферация CD8⁺ лимфоцитов условно-здоровых доноров в присутствии различных стимуляторов (n = 6). Среднее и ошибка среднего.

Примечание: * — статистически значимые различия по сравнению с группой контроля, $p \leq 0.05$. Контроль — культура CD8⁺ клеток без стимуляции. Anti-CD3 (4 мкг/мл) — позитивный контроль пролиферации.

Подбор клеток-мишеней для анализа специфического противоопухолевого клеточного иммунного ответа

Для анализа цитотоксичности *in vitro*-генерируемых популяций HER2-специфичных клеток необходимо было подобрать опухолевую клеточную линию человека, экспрессирующую антиген HER2/neu и несущую аллель HLA A*02. Поскольку наиболее распространенной локализацией опухоли, чрезмерно экспрессирующей HER2 на поверхности клеток, является молочная железа, мы ограничились своим выбором линиями, происходящими от опухолей данной локализации. В Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККП) было обнаружено три линии-кандидата: BT-474 (HER2 3+), ZR-75/1 (HER2 2+), MCF-7 (HER2 0-1+). По результатам генотипирования клеточных линий-кандидатов на роль опухолевых клеток-мишеней была выбрана линия MCF-7, поскольку данная линия оказалась HLA A*0201⁺, тогда как BT-474 и ZR-75/1 оказались негативными по экспрессии HLA A*02.

Поскольку в научной литературе линия MCF-7 описана как слабо экспрессирующая антиген HER2/neu, нам было важно проверить наличие экспрессии гена *ErbB2*, кодирующего данный белок, в клетках исследуемой линии. Наличие экспрессии *ErbB2* в клетках линии MCF-7 было подтверждено с использованием реакции ОТ-ПЦР в режиме реального времени и электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Анализ кривых амплификации и плавления продукта ОТ ПЦР, а также электрофорез продукта на агарозном геле (только один продукт амплификации с ожидаемым размером) подтвердил, что в реакции присутствует только один продукт, представляющий собой продукт амплификации *ErbB2*.

Данный факт в совокупности с положительным результатом анализа наличия аллели HLA A*02 у клеток данной линии стал основанием к выбору клеток MCF-7 в качестве клеток-мишеней для оценки цитотоксичности HER2-специфичных HLA-A*02⁺ ЦТЛ.

Эффекторные свойства HER2-специфичных ЦТЛ

Согласно результатам анализа прямой цитотоксичности, цитотоксичность культур HER2-специфичных клеток (рисунок 8, 75-спец. ЦТЛ и E88-спец.ЦТЛ) значительно превысила таковую для контрольных культур: культуры активированных моноклеаров и дендритных клеток, не содержащей клонов E75- и E88-специфичных клеток (рисунок 8, МНК+ДК), а также общей культуры CD8⁺ Т-клеток всех возможных специфичностей, имеющихся в исследуемых культурах, за исключением E75- и E88-специфичных CD8⁺ Т-клеток (рисунок 8, CD8⁺ Т-клетки).

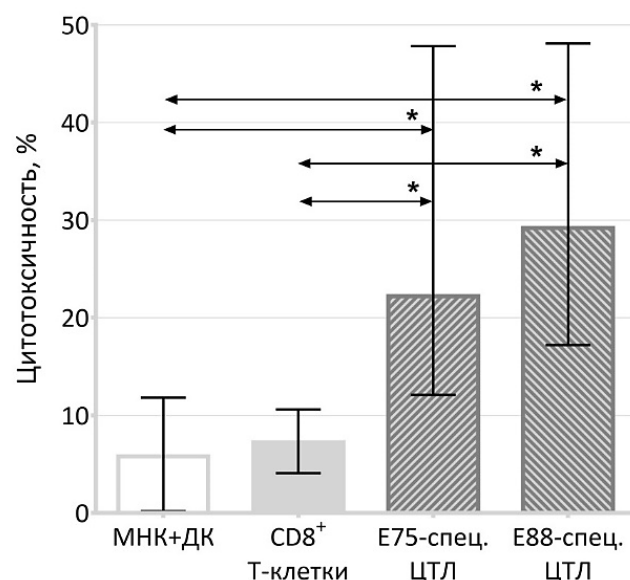


Рисунок 8 — Цитотоксичность культуры HER2-специфичных Т-лимфоцитов против клеточной линии MCF-7 (n = 12). Медиана и межквартильный интервал. $p < 0.05$.

Можно утверждать, что гибель клеток линии MCF-7 опосредована именно цитотоксическим действием Т-лимфоцитов, поскольку исследуемые пробы содержали в себе только клетки опухолевой линии и фракцию антиген-специфичных Т-клеток, что, с учетом поставленных контролей на спонтанную гибель клеток-мишеней, исключает возможность влияния других факторов на гибель опухолевых клеток.

Иммуноферментный анализ совместных культур клеток-эффекторов и клеток-мишеней показал шестикратное увеличение продукции IFN- γ E75- и E88-специфичными ЦТЛ в ответ на предъявление клеток-мишеней (рисунок 9). Кроме того, продукция IFN- γ эпитоп-специфичными ЦТЛ почти в два раза превысила значение таковой для популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов, активированных в той же культуре MNK и ДК, трансфицированных плазмидой HER2, но не содержащей клеток, специфичных к эпитопам E75 и E88. Таким образом, продукция IFN- γ имеет место при неспецифическом Т-клеточном иммунном ответе, однако уровень продукции IFN- γ существенно выше у CD8⁺ Т-клеток, реализующих антиген-специфическую цитотоксическую функцию.

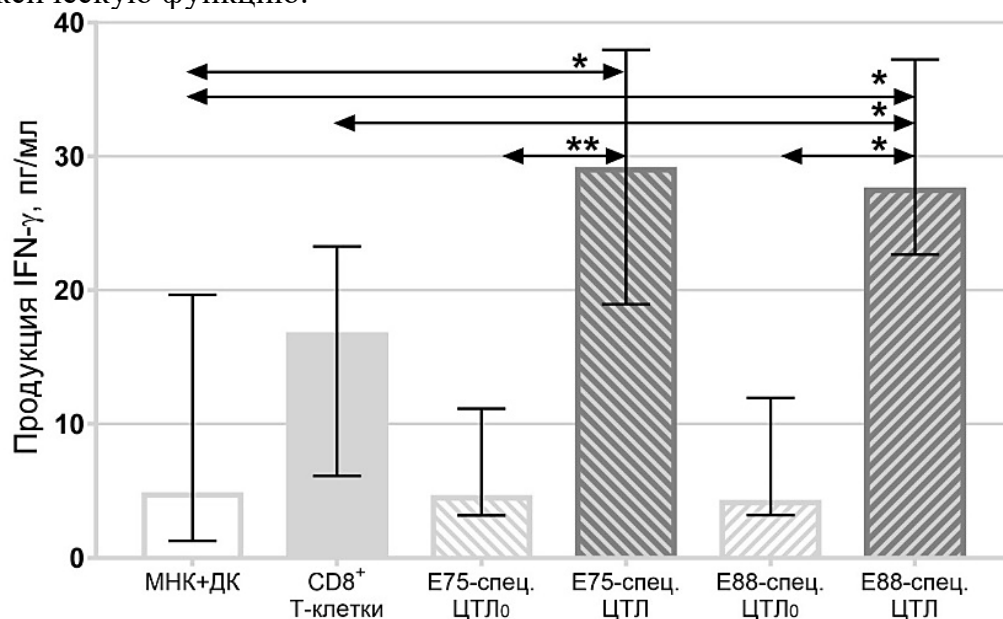


Рисунок 9 — Содержание IFN- γ в кондиционных средах культур моноклеарных клеток после 48 часов совместного культивирования с MCF-7 (n = 6). Медиана и межквартильный интервал. * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$.

Примечание: E75-спец. ЦТЛ₀ — кондиционные среды от культур E75-специфичных ЦТЛ без совместного культивирования с MCF-7.

E88-спец. ЦТЛ₀ — кондиционные среды от культур E88-специфичных ЦТЛ без совместного культивирования с MCF-7.

МНК+ДК — кондиционные среды от совместных культур МНК+ДК_{HER2}, обедненных по популяциям E75- и E88-специфичных ЦТЛ, после 48 часов совместного культивирования с MCF-7.

CD8⁺ Т-клетки — кондиционные среды от культур CD8⁺ Т лимфоцитов, отсортированных из МНК+ДК, после 48 часов совместного культивирования с MCF-7.

E75-спец. ЦТЛ — кондиционные среды от культур E75-специфичных ЦТЛ после 48 часов совместного культивирования с MCF-7.

E88-спец. ЦТЛ — кондиционные среды от культур E88-специфичных ЦТЛ после 48 часов совместного культивирования с MCF-7.

Известно, что IFN- γ представляет собой цитокин, участвующий в антипролиферативном [Hobeika et al., 1999; Mori et al., 2008], антиангиогенном [Beatty, Paterson, 2001; Zaidi, Merlino, 2011] и проапоптотическом [Chawla-Sarkar et al., 2003] эффектах против раковых клеток. IFN- γ используется в клинической практике для лечения различных злокачественных новообразований [Miller et al., 2009]. Одним из важнейших действий IFN- γ противоопухолевого характера является также повышение экспрессии молекул МНС на поверхности опухолевых клеток [Shao et al., 2017], зачастую критически важное для реализации специфической цитотоксичности эффекторными клетками, поскольку известно, что опухолевые клетки могут утрачивать экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости [Korkoroulou et al., 1996; Tu et al., 2017]. При этом известно, что влияние IFN- γ на опухолевый иммунитет может быть разнонаправленным [Zaidi, Merlino, 2011]. В настоящее время исследователи полагают, что направленность действия IFN- γ зависит от клеточного окружения и молекулярного контекста. На модели опухоли молочной железы мыши *in vivo* показано, что присутствие IL-7 способствует стимуляции секреции CD8⁺ Т-клетками IFN- γ с противоопухолевой активностью [Yuan et al., 2014]. Исследования, подтверждающие мощное противоопухолевое действие данного цитокина, продолжают появляться [Martini et al., 2010; Shao et al., 2017].

Фенотипирование HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов

На сегодняшний день основным методом оценки гетерогенности Т-клеточного пула периферической крови является проточная цитометрия. Основным фенотипическим признаком Т-клеток памяти принято считать появление изоформы CD45RO⁺ взамен изоформы CD45RA⁺. В комбинации с данными маркерами для фенотипического определения субпопуляций CD8⁺ Т-клеток памяти используют молекулы CD62L и CCR7, опосредующие хоминг клеток в лимфоидные органы [Кудрявцев, 2014; Mahnke et al., 2013]. Стоит отметить, что единых общепринятых фенотипических критериев разделения клеток памяти на субпопуляции до сих пор нет.

В настоящем исследовании фенотип HER2-специфичных ЦТЛ исследовался путем одновременного мечения клеток совместных культур МНК и ДК от 6 условно-здоровых доноров маркерами, используемыми для определения Т-клеток памяти, и антиген-специфичными реагентами технологии Streptamer. Исследуемые CD8⁺ Т-лимфоциты были разделены на 5 основных субпопуляций, определяемые в пуле циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов: наивные Т-лимфоциты (T_N), Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток (T_{SCM}), Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}) и терминально-дифференцированные цитотоксические Т-лимфоциты (T_{EMRA}) [Takata et al., 2012; Mahnke et al., 2013; Кудрявцев, 2014; Samji, Khanna, 2017]. Наибольшей продолжительностью жизни и способностью к самоподдержанию среди перечисленных активированных субпопуляций обладают T_{SCM}, причем способность к длительной пролиферации снижается, а уровень дифференцировки повышается в ряду T_{SCM} - T_{CM} - T_{EM} - T_{EMRA}. При этом реализация эффекторных функций и секреция IFN- γ наиболее выражена у популяций T_{EM} и T_{EMRA}, а субпопуляция T_{SCM} характеризуется как способностью к секреции IFN- γ , так и высоким уровнем жизнеспособности, способностью к самоподдержанию и дифференцировке в клетки T_{CM} или T_{EM}.

Панель антител и реагентов, подобранная для восьмицветного цитометрического анализа перечисленных субпопуляций, представлена в **таблице 1**.

Таблица 1 — Панель цитометрических моноклональных антител и маркерам человека и реагентов, подобранная для цитометрического определения субпопуляционного состава HER2-специфичных ЦТЛ.

№ п.п	Антитело / реагент	Флуорохром	Длина волны возбуждения, нм / лазер	Эмиссия, нм
1	Anti-CD8	Brilliant-Violet-510	405 / фиолетовый	510
2	Anti-CD45RA	Pacific-Blue	405 / фиолетовый	452
3	Anti-CD62L	APC-Cy7	640 / красный	785
4	Anti-CD127-	APC	640 / красный	660
5	Anti-CD95-	PE-Cy7	488 / синий	785
6	Anti-CD28-	FITC	488 / синий	519
7	Anti-CD27-	Per CP	488 / синий	678
8	Молекулы Streptamer	PE	488 / синий	578

Процентное соотношение исследуемых субпопуляций представлено на рисунке 10.

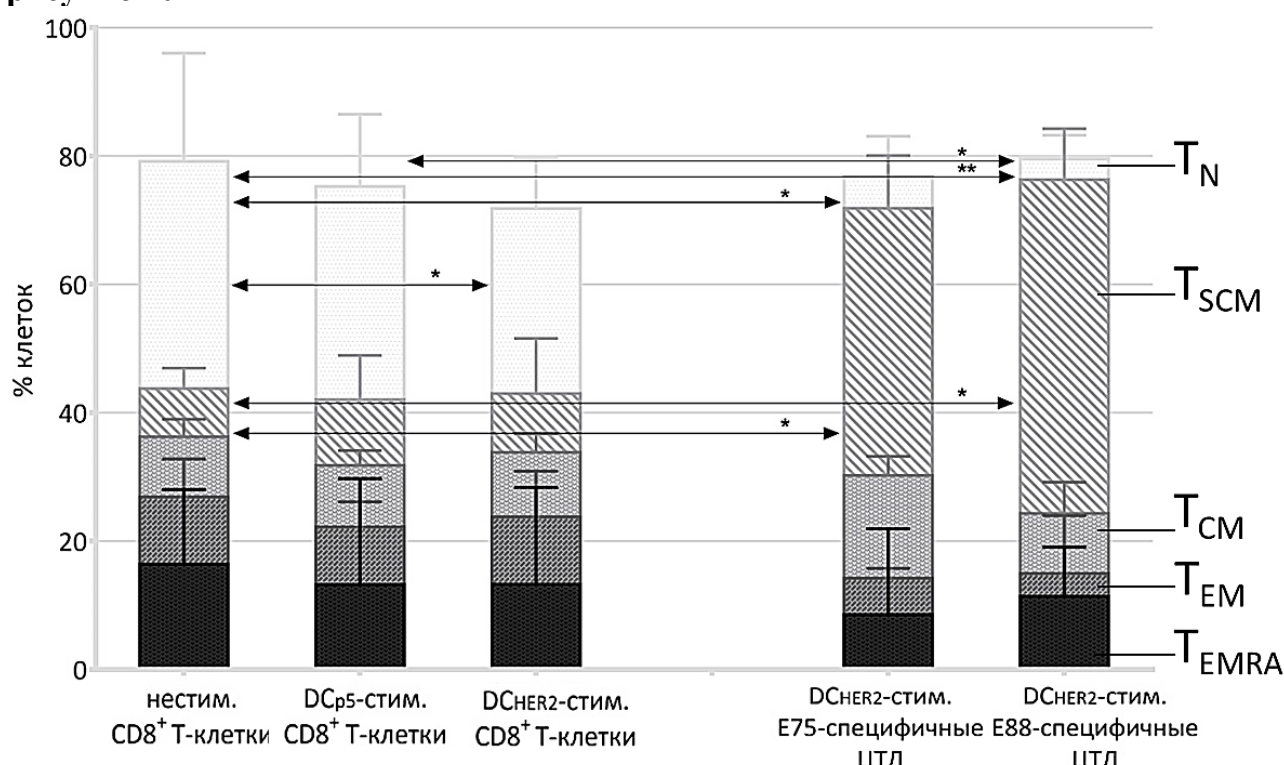


Рисунок 10 — Субпопуляционный состав исследуемых Т-клеток. Медиана и межквартильный интервал (верхний квартиль отображен). * — $p \leq 0.05$, ** — $p < 0.01$. (Friedman test with Dunn's multiple comparisons test, $n = 6$).

Примечание: Три левых столбца — субпопуляционный состав общих популяций $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Два правых столбца — субпопуляционный состав популяций E75- и E88-специфичных $CD8^+$ Т-лимфоцитов.

T_N — наивные Т-клетки ($CD8^+CD45RA^+CD62L^+CD127^+CD27^+CD28^+CD95^-$), T_{SCM} — Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток ($CD8^+CD45RA^+CD62L^+CD127^+CD27^+CD28^+CD95^+$), T_{CM} — Т-клетки центральной памяти ($CD8^+CD45RA^-CD62L^+$), T_{EM} — Т-клетки эффекторной памяти ($CD8^+CD45RA^-CD62L^-$), T_{EMRA} — терминально-дифференцированные цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+CD45RA^+CD62L^-$).

Видно, что на уровне популяции всех $CD8^+$ Т-клеток исследуемой культуры МНК (рисунок 10, три левых столбца) не наблюдается существенных сдвигов в субпопуляционном составе после активации как HER2-трансфицированными ДК (рисунок 10, третий слева столбец), так и p5-трансфицированными ДК (второй слева столбец), но видна тенденция к активации $CD8^+$ Т-лимфоцитов, проявляющаяся в сокращении относительного количества наивных Т-клеток в популяции DC_{HER2} -

активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов (**третий слева столбец**) по сравнению с неактивированными клетками (**первый слева столбец**).

При этом в популяциях E75- и E88-специфичных CD8⁺ Т-клеток (**два крайних правых столбца на рисунке 10**) наблюдаются схожие паттерны в распределении процентных долей рассматриваемых субпопуляций, при этом распределение субпопуляций внутри HER2-специфичных Т-клеток обеих специфичностей (**два крайних правых столбца**) существенно отличается от такового для пула нестимулированных CD8⁺ Т-клеток (**первый слева столбец**). В частности, наблюдается существенное более низкое содержание клеток с фенотипом T_N, существенно более высокое содержание клеток с фенотипом T_{SCM}, а также увеличение доли активированных Т-клеток и Т-лимфоцитов с фенотипом памяти в целом.

Таким образом, значимо более низкое содержание наивных Т-клеток в популяциях E75- и E88-специфичных ЦТЛ опытных проб, а также в общей культуре CD8⁺ клеток периферической крови, указывает на то, что использование дендритных клеток, трансфицированных плазмидой HER2, приводит к эффективной активации специфического Т-клеточного цитотоксического иммунного ответа. Примечательно, что наибольшую долю от общего числа эпитоп-специфичных клеток составляет популяция Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток. Данная популяция характеризуется сочетанием выраженных эффекторных свойств и способности к длительному самоподдержанию, чем привлекает всё больший интерес у исследователей в области противоопухолевого иммунного ответа [Gattinoni et al., 2011; Кудрявцев, 2014; Flynn et al., 2015]. T_{SCM} являются наименее дифференцированными из всех субпопуляций памяти, но способны секретировать IFN-γ, IL-2 и TNF-α в ответ на α-CD3/CD2/CD28 стимуляцию [Gattinoni et al., 2011]. Данные свойства делают популяцию T_{SCM} наиболее «перспективной» для дальнейшего использования в адоптивной Т-клеточной терапии. Известно, что IL-2 необходим для поддержания жизнеспособности Т-лимфоцитов, а IL-7 и IL-15 играют ключевую роль в запуске пролиферации *in vitro*, помимо сигнала от Т-клеточного рецептора и дополнительного сигнала от костимулирующих молекул. При этом, как упоминалось ранее, Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток отличаются высоким уровнем экспрессии CD122 (общей β-цепи рецептора для IL-2 и IL-15) и CD127 (IL-7Rα). Упомянутые особенности фенотипа клеток памяти были учтены нами при подборе цитокинов для стимуляции пролиферации отсортированных HER2-специфичных Т-клеток: выделенные HER2-специфичные Т-лимфоциты культивировали в присутствии цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15, в концентрации 50 нг/мл для каждого.

Суммируя приведенные результаты, можно заключить, что разработанный протокол получения антиген-специфичных противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, основанный на стимуляции моноклеарных клеток зрелыми аутологичными ДК, полученными *in vitro* из моноцитов периферической крови, трансфицированными ДНК конструкцией, кодирующей эпитопы опухоль-ассоциированного белка HER2, с последующим выделением целевой популяции с помощью технологии обратимого окрашивания антиген-специфичных клеток стрептамерами и наработкой выделенных цитотоксических Т-лимфоцитов путем культивирования в присутствии коктейля цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15, является эффективным и позволяет получать чистые популяции клеток, способные лизировать опухолевые клетки.

ВЫВОДЫ

1. Показано наличие цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 опухолевого антигена HER2/neu, в периферической крови здоровых индивидов и значительно более высокое их содержание в крови пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы, что свидетельствует о наличии HER2-специфического иммунного ответа у пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.

2. Протокол получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов с помощью дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации антиген-специфичных клеток, позволяет повысить содержание E75-специфичных Т-лимфоцитов в среднем в 8 раз, содержание E88-специфичных Т-лимфоцитов — в среднем в 22 раза, а также позволяет получать популяции HER2-специфичных Т-лимфоцитов, содержащие порядка 71,5% CD8⁺ клеток в культуре E88-специфичных Т-лимфоцитов и 90,2% — в культуре E75-специфичных Т-лимфоцитов, что указывает на эффективность активации HER2-специфического иммунного ответа с помощью аутологических антиген-активированных дендритных клеток, а также на высокую чистоту выделения целевых популяций.

3. Полученные HER2-специфичные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются более высоким уровнем цитотоксичности в отношении опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и продуцируют большее количество IFN-γ в ответ на предъявление данных опухолевых клеток, по сравнению с общими фракциями активированных МНК и CD8⁺ Т-лимфоцитов, не содержащими клонов E75- и E88-специфичных клеток, что указывает на наличие специфического цитотоксического ответа HER2-специфичных CD8⁺ Т-клеток против HER2-экспрессирующих опухолевых клеток.

4. Субпопуляционный состав E75-специфичных и E88-специфичных Т-лимфоцитов культуры моноклеональных клеток и дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы антигена HER2/neu, характеризуется значительным содержанием (более 40%) Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток и существенно меньшим содержанием наивных Т-клеток по сравнению с таковым в популяции CD8⁺ Т-клеток периферической крови, что свидетельствует о произошедшей активации HER2-специфичных Т-клеток.

5. Разработанный подход к активации HER2-специфического иммунного ответа, сочетающий использование дендритных клеток, трансфицированных плазмидой HER2, с выделением и наработкой антиген-специфичных Т-клеток, позволяет получать популяции E75- и E88-специфичных Т-лимфоцитов, в значительной степени представленные Т-клетками памяти и, прежде всего, Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, а также способные проявлять выраженную специфическую цитотоксичность и продуцировать большее количество γ-интерферона в ответ на предъявление HER2-позитивных опухолевых клеток.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кузнецова М.С.**, Лопатникова Ю.А. Выделение и наработка антигенспецифических цитотоксических противоопухолевых Т-лимфоцитов // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых (Пушкино, 21 - 25 апреля 2014 г.). Сборник тезисов. – С. 344.
2. Шевченко Ю.А., Курилин В.В., Христин А.А., Фалалеева С.А., **Кузнецова М.С.**, Сидоров С.В., Сенников С.В. Исследование фенотипических свойств дендритных клеток периферической крови больных раком молочной железы. // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Том 8(17). – С. 428-429.
3. Шевченко Ю.А., Христин А.А., Курилин В.В., Фалалеева С.А., **Кузнецова М.С.**, Сидоров С.В., Сенников С.В. Изучение фенотипических и функциональных свойств субпопуляций дендритных клеток у пациентов с раком молочной железы // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 5 – С. 255.
4. Сенников С.В., **Кузнецова М.С.**, Шевченко Ю.А., Облеухова И.А., Лопатникова Ю.А. Разработка технологии получения антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов // Материалы VIII Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития" 17-20 марта 2015 г., Москва, Россия. – С.143-144
5. Шевченко Ю.А., Христин А.А., Фалалеева С.А., Курилин В.В., **Кузнецова М.С.**, Сидоров С.В. Фенотипические и функциональные свойства дендритных

- клеток и содержание супрессорных клеточных популяций в периферической крови больных раком молочной железы. // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 4. – С. 519-523.
6. **Кузнецова М.С.**, Лопатникова Ю.А., Максюттов А.З., Куликова Е.В., Хантакова Ю.Н., Сенников С.В. Получение популяций активированных противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к опухоль-ассоциированному антигену HER2/neu. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19). – № 2 (1). – С. 168-170.
7. **Кузнецова М.С.**, Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Фенотипические и функциональные характеристики HER2-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов. // Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии. Материалы IX отчетной научной сессии НИИФКИ. Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии. Новосибирск, 16-17 июня 2016 г.
8. Сенников С.В., Лопатникова Ю.А., **Кузнецова М.С.**, Хантакова Ю.Н., Куликова Е.В., Максюттов А.З. Патент на изобретение «Способ получения in vitro популяций активированных антигенспецифических противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена». №2619186. Оpubл. 12.05.2017. Бюл. №14.
9. **Maria Kuznetsova**, Julia Lopatnikova, Julia Khantakova, Rinat Maksyutov, Amir Maksyutov, Sergey Sennikov. Generation of populations of antigen-specific cytotoxic T cells using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes. // BMC Immunology. – 2017. – Vol. 18(1). – № 31. DOI: 10.1186/s12865-017-0219-7.
10. **Kuznetsova M.**, Lopatnikova J., Kalichkin A., Sennikov S. Development of technology for obtaining antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes. European Journal of Immunology 2018 Vol. 48(1). – P. 177. DOI: 10.1002/eji.201871000.
11. **M. Kuznetsova**, J. Lopatnikova, S. Sennikov. Phenotypic and functional characteristics of HER2-specific cytotoxic T lymphocytes activated by DNA-transfected dendritic cells and enriched by magnet sorting and cytokine stimulation. Abstracts of the 5th European Congress of Immunology - ECI 2018 Amsterdam, The Netherlands, September 2-5, 2018. – P. 297.
12. **M. Kuznetsova**, J. Lopatnikova, S. Sennikov. Obtaining and enrichment of antigen-specific cytotoxic t lymphocytes with cytotoxic activity against HER2-expressing tumor cells. // Abstract book from the “Cytokines 2018” congress 27-30 October, 2018, Boston. – P. 57.
13. **Kuznetsova Maria**, Lopatnikova Julia, Shevchenko Julia, Silkov Alexander, Maksyutov Amir, Sennikov Sergey. Cytotoxic activity and memory T cell subset distribution of in vitro-stimulated CD8⁺ T cells specific for HER2/neu epitopes. // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01017.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДК	— дендритные клетки
МНК	— моноклеарные клетки
ПК	— периферическая кровь
РМЖ	— рак молочной железы
ЦТЛ	— цитотоксические Т-лимфоциты
CD	— cluster of differentiation, кластер дифференцировки
FasL	— Fas-ligand, FAS-лиганд
HER2	— Human epidermal growth factor receptor-2, человеческий эпидермальный фактор роста-2
HLA	— Human Leukocyte Antigen, человеческий лейкоцитарный антиген
IFN	— interferon, интерферон
IL	— interleukin, интерлейкин
МНС	— major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости
TNF	— tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли
TRAIL	— TNF-related apoptosis-inducing ligand, апоптоз-индуцирующий лиганд семейства TNF