

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-302

**ЭФФЕКТИВНАЯ ИНДУКЦИЯ КЛОНАЛЬНОЙ ЭКСПАНСИИ
E7-СПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК: МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПРОТОКОЛ
НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК^{*}**

**EFFICIENT INDUCTION OF CLONAL EXPANSION OF E7-SPECIFIC T CELLS:
A MODIFIED DENDRITIC CELL-BASED PROTOCOL**

А. Алсаллум¹, Ю. А. Лопатникова¹, М. С. Фишер^{1,2}, Ю. А. Шевченко^{1,2},
Ю. Г. Филиппова¹, П. А. Шаньгина¹, С. В. Сенников¹

¹*НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск*

²*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*

A. Alsalloum¹, J.A. Lopatnikova¹, M. S. Fisher^{1,2}, J.A. Shevchenko^{1,2},
J. G. Filippova¹, P.A. Shangina¹, S. V. Sennikov¹

¹*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*

²*I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ alaa.alsalloum19996@gmail.com

Аннотация

Рак шейки матки, ассоциированный с ВПЧ, остается серьезной проблемой. Иммуногенные эпитопы E6 и E7 ВПЧ представляют собой перспективные мишени для разработки ТCR-T-клеточной иммунотерапии. В данном исследовании был разработан протокол экспансии E7-специфичных CD8+-T-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, нагруженных пептидом. Модификация протокола позволила увеличить количество антиген-специфических Т-клеток с 0,007 до 3 %.

Abstract

HPV-associated cervical cancer remains a significant global health challenge. The immunogenic epitopes E6 and E7 of HPV serve as promising targets for TCR-T cell immunotherapy. This study developed a protocol to expand E7-specific CD8+ T lymphocytes using peptide-loaded dendritic cells. Protocol optimization increased antigen-specific T cell frequency from 0.007 to 3 %.

Введение

Основной причиной развития рака шейки матки является хроническая инфекция высокоонкогенными штаммами вируса папилломы человека (ВПЧ), особенно типов 16 и 18, которые ответственны более чем за 70 % случаев заболевания [1]. Белки E6 и E7 ВПЧ являются ключевыми мишениями для терапевтического воздействия, поскольку они ингибируют опухолевые супрессоры p53 и pRb, что приводит к неконтролируемой пролиферации клеток [2]. Перспективным подходом является Т-клеточная терапия, основанная на ТCR, который распознает эпитопы E6/E7, представленные главным комплексом гистосовместимости (МНС), что инициирует активацию Т-клеток и последующее уничтожение инфицированных клеток [3]. Кроме того, современные исследования показывают, что комбинация ТCR-терапии с иммунотерапевтическими препаратами, такими как ингибиторы контрольных точек (например, анти-PD-1), может значительно повысить ее эффективность [4].

Цель исследования — разработать технологию формирования специфического поликлонального иммунного ответа с помощью дендритных клеток для индукции клонов E7- специфических цитотоксических Т-лимфоцитов с широким спектром аффинностей.

Материалы и методы

Для проведения анализа исходного содержания антиген-специфических клеток в периферической крови условно здоровых доноров и выбора наиболее подходящих доноров было проведено определение изотипа HLA-A02:01 у добровольцев с помощью метода проточной цитометрии. Для выполнения анализа уровня содержания антиген-специфических клеток использовались реагенты Flex-T™ (Biolegend) и синтезированный пептид E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET). Оценка эффективности замены UV-лабильного пептида на пептид E7 проводилась с помощью ИФА. Окрашивание клеток тетрамерами проводилось согласно оптимизированному протоколу производителя, анализ выполнялся на проточном цитофлуориметре Attune. Дендритные клетки условно здоровых доноров были получены по протоколу, разработанному ранее в лаборатории [5], с внесением дополнительных модифика-

^{*} Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00070).

ций. Оценка фенотипа дендритных клеток в протоколе нагрузки иммуногенными пептидами антигена E7 ВПЧ проводилась с помощью меченых флуорохромами антител и проточной цитометрии.

Результаты

Оптимизированный протокол для получения тетрамеров для идентификации Т-клеточных рецепторов, распознающих пептид белка E7, позволил получить реагенты для окрашивания с эффективностью 85 % замены UV-лабильного пептида. С использованием данных реагентов на основании первичного скрининга из 10 человек, несущих HLA-A02:01, были выбраны 4 условно здоровых донора с наиболее высоким уровнем исходного содержания E7-специфических цитотоксических лимфоцитов. В протокол получения и нагрузки дендритных клеток пептидом E7 ВПЧ были внесены изменения (увеличение дозы пептида для нагрузки и дополнительная нагрузка пептидом лимфоцитов), позволившие увеличить количество CD8+-антиген-специфических клеток, распознающих пептид E7 в комплексе с HLA в среднем до 3 % (при исходных 0,007 %).

Выводы

Разработанный протокол индукции клональной экспансии E7-специфических Т-клеток обеспечил увеличение их количества более чем в 400 раз, что подтверждает его эффективность для генерации антиген-специфического иммунного ответа.

Литература

1. Doorbar J. et al. The biology and life cycle of human papillomaviruses // Vaccine. 2012. Vol. 30. P. F55–F70.
2. Shillitoe E. J. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy // Cancer Gene Therapy. 2006. Vol. 13. P. 445–450.
3. Jin B. Y. et al. Engineered T cells targeting E7 mediate regression of human papillomavirus cancers in a murine model // JCI Insight. 2018. Vol. 3.
4. Shafer P., Kelly L. M., Hoyos V. Cancer therapy with TCR engineered T cells: current strategies, challenges, and prospects // Frontiers in Immunology. 2022. Vol. 13. P. 835762.
5. Sennikov S. et al. Modified dendritic cell based T cell expansion protocol and single cell multi omics allow for the selection of the most expanded and in vitro effective clonotype via profiling of thousands of MAGE A3 specific T cells // Frontiers in Immunology. 2024. Vol. 15. P. 1470130.