

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-217

**УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ TCR\*****ADVANCED CANCER IMMUNOTHERAPY: HARNESSING SINGLE-CELL SEQUENCING TO DISCOVER NATURALLY-OCCURRING ANTIGEN-SPECIFIC TCRS**

С. Алрхмун<sup>1,2</sup>, М. С. Фишер<sup>1</sup>, Ю. А. Лопатникова<sup>1</sup>, О. Ю. Перик-Заводская<sup>1</sup>,  
М. О. Вольнец<sup>1</sup>, Р. Ю. Перик-Заводский<sup>1</sup>, Ю. А. Шевченко<sup>1</sup>, К. В. Назаров<sup>1</sup>,  
Ю. Г. Филиппова<sup>1</sup>, А. Алсаллум<sup>1</sup>, В. В. Курилин<sup>1</sup>, А. Н. Силков<sup>1</sup>, С. В. Сенников<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

<sup>2</sup>Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup>Институт медицины и медицинских технологий, Новосибирский государственный университет

S. Alrhoun<sup>1,2</sup>, M. S. Fisher<sup>1</sup>, J. A. Lopatnikova<sup>1</sup>, O. Y. Perik-Zavodskaja<sup>1</sup>,  
M. O. Volynets<sup>1</sup>, R. Y. Perik-Zavodskii<sup>1</sup>, J. A. Shevchenko<sup>1</sup>, K. V. Nazarov<sup>1</sup>,  
J. G. Philippova<sup>1</sup>, A. Alsalloum<sup>1</sup>, V. V. Kurilin<sup>1</sup>, A. N. Silkov<sup>1</sup>, S. V. Sennikov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

<sup>2</sup>Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University

<sup>3</sup>Institute of Medicine and Medical Technologies, Novosibirsk State University

✉ saleh.alrhoun1@gmail.com

**Аннотация**

Адаптивная клеточная терапия, в частности Т-клеточная терапия (TCR-T), представляет собой передовую стратегию лечения солидных опухолей [1]. Современные методы разработки TCR-T-клеточной терапии позволяют получить ограниченное количество кандидатов TCR [2], что ограничивает полное представление репертуара и затрудняет идентификацию наиболее эффективных TCR. Это подчеркивает необходимость разработки новых методов разработки TCR-T-клеточной терапии.

**Abstract**

Adoptive cell therapy, particularly T cell receptor-engineered T (TCR-T) cell therapy, represents a cutting-edge and promising strategy for treating solid tumors [1]. Current methods for developing TCR-T cell therapies yield a limited number of candidate TCRs [2], missing the comprehensive view of the repertoire, which may impede the identification of the most effective TCRs. This limitation highlights the need for new techniques in TCR-T cell therapy development.

**Цель** — разработать новый подход к обнаружению и анализу всего репертуара природных антигенспецифических TCR с целью выявления наиболее эффективных TCR для применения в TCR-T-клеточной терапии.

**Материалы и методы.** Дендритные клетки условно здоровых доноров были нагружены иммуногенными пептидами интересующего антигена для получения антигенспецифических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов из периферической крови. Впоследствии весь репертуар природных полноразмерных антигенспецифических TCR был проанализирован с помощью секвенирования мРНК единичных клеток. Этот анализ включал оценку доминантности клонотипов, иммунного транскриптома и вероятности связывания с комплексом пептид/МНС с использованием инструмента TCRscape [3] и нейронной сети ERGO-II [4]. Эти анализы были направлены на выявление наиболее эффективных TCR-кандидатов для разработки TCR-T-клеточной терапии. В конце были получены TCR-T-клетки, экспрессирующие TCR-кандидат, и проведена оценка их функциональности и селективности.

Полученные FASTQ файлы были обработаны с помощью BD pipeline версии 1.12 для получения финальных матриц экспрессии генов. Затем мы запустили инструмент ERGO-II, выбрав входной файл и базу данных (McPAS-TCR) [5]. ERGO-II требует информации о последовательностях TCR CDR3α и CDR3β, пептидной последовательности, типе МНС, генах V и J и типе Т-клеток. Выходной файл содержал прогнозируемые вероятности связывания TCR с комплексом пептид/МНС, которые варьировались от 0 до 1.

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 21-65-00004).

© С. Алрхмун, М. С. Фишер, Ю. А. Лопатникова, О. Ю. Перик-Заводская, М. О. Вольнец, Р. Ю. Перик-Заводский, Ю. А. Шевченко, К. В. Назаров, Ю. Г. Филиппова, А. Алсаллум, В. В. Курилин, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2024

Затем мы импортировали матрицы экспрессии генов каждого биологического образца, матрицу прогнозируемых вероятностей связывания из ERGO-II, а также матрицу репертуара адаптивных иммунных рецепторов (AIRR) в TCRscape, после чего выполнили нормализацию по  $\log_2$  CPM (количество на миллион) для объединенной матрицы и подсчитали доминирующие клонотипы TCR, затем мы выполнили анализ главных компонент PCA, чтобы оценить размерность данных, и уменьшение размерности UMAP для совместного внедрения клонотипов, прогнозируемых вероятностей связывания и данных об экспрессии генов. После этого мы сгруппировали клетки с помощью HDBSCAN [6] и нашли доминирующий клонотип, используя прогнозируемые вероятности связывания и количество клеток на клонотип.

**Результаты.** Разработанный протокол продемонстрировал способность значительно увеличивать процент антигенспецифических T-клеток, достигая увеличения более чем в 200 раз. Кроме того, с его помощью было успешно идентифицировано более 100 различных антигенспецифических клонотипов TCR. Полученные в результате TCR-T-клетки проявляют высокий уровень цитотоксичности и селективности по отношению к целевому антигену, что подчеркивает их способность предпочтительно воздействовать на опухолевые клетки и уничтожать их.

**Выводы.** Нами был разработан всесторонний подход к обнаружению и анализу не только нескольких, но и всего репертуара природных антигенспецифических TCR, что позволяет идентифицировать наиболее эффективный TCR для разработки TCR-T-клеточной терапии. Кроме того, разработанный протокол может быть адаптирован к различным антигенам и вариантам МНС, что делает его универсальным инструментом как для научных исследований, так и для клинических применений.

### Литература

1. Wei F., Cheng X. X., Xue J. Z., Xue S. A. Emerging Strategies in TCR-Engineered T Cells // *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 850358.
2. Scheper W., Kelderman S., Fanchi L. F. et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers // *Nat. Med.* 2018. Vol. 25 (1). P. 89–94.
3. Perik-Zavodskii/TCRscape: TCRscape — a tool for simultaneous multimodal gene expression and clonotype analysis of single T-cells profiled via the BD Rhapsody system. URL: <https://github.com/Perik-Zavodskii/TCRscape>.
4. IdoSpringer/ERGO-II: ERGO-II, an updated version of ERGO including more features for TCR-peptide binding prediction. URL: <https://github.com/IdoSpringer/ERGO-II>.
5. Tickotsky N., Sagiv T., Prilusky J. et al. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences // *Bioinformatics.* 2017. P. 2924–2929.
6. McInnes L., Healy J., Astels S. hdbscan: Hierarchical density based clustering // *J. Open Source Softw.* 2017. Vol. 2. P. 205.