

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047688**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.27

(21) Номер заявки
202290055

(22) Дата подачи заявки
2020.08.05

(51) Int. Cl. *A61P 37/00* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) **МАНИПУЛЯЦИИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК**

(31) **62/882,810**

(32) **2019.08.05**

(33) **US**

(43) **2022.12.06**

(86) **PCT/US2020/045006**

(87) **WO 2021/026233 2021.02.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ЗЕ
ЛЕЛАНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(56) CHAKRABORTY et al.: "Providence of the CD25+ KIR+ CD127-FOXP3-CD8+ T-cell subset determines the dynamics of tumor immune surveillance," Immunol Cell Biol, 17 August 2018 (17.08.2018), Vol. 96, No. 10, Pgs. 1035-1048, entire document

WO-A1-2018152340

WO-A1-2016196912

WO-A2-2012054509

WO-A2-2007042573

(72) Изобретатель:
**Салиграма Нареша, Дэвис Марк, Ли
Цзин (US)**

(74) Представитель:
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)**

(57) Композиции и способы предусмотрены для выделения, манипулирования и использования в лечебных и других целях млекопитающих, МНС класса I ограниченных, антиген-специфических регуляторных Т-клеток. Регуляторные Т-клетки могут быть охарактеризованы как CD8+ клетки, которые специфически подавляют реакции самореактивных и/или патогенных CD4+ Т-клеток с помощью цитотоксических механизмов, включая, без ограничений, перфорин, другие компоненты пути апоптоза перфорина/гранзима и т.д. Регуляторные Т-клетки являются антиген-специфическими, но не активируются тем же антигеном, что и самореактивные и/или патогенные CD4+ Т-клетки. У людей регуляторные Т-клетки экспрессируют ингибирующие белки KIR, например один или несколько KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR3DL1.

B1

047688

047688

B1

Перекрестная ссылка

Эта заявка претендует на преимущества Предварительной патентной заявки США № 62/882810, поданной 5 августа 2019 г., заявки на которую включены в настоящий документ путем ссылки в полном объеме.

Предыстория

Существует давний интерес к манипулированию клетками иммунной системы для достижения контроля аутоиммунных и других воспалительных заболеваний. Традиционные методы лечения, как правило, не были антигенспецифичными. Например, для общей иммуносупрессии используются такие агенты, как метилпреднизолон, другие стероиды, метотрексат, кладрибин, циклофосфамид. Однако общая иммуносупрессия, которую обеспечивают эти методы лечения, имеет значительные нежелательные побочные эффекты.

Более селективная модификация иммунной системы использует агенты, блокирующие цитокины, например, антитела против $\text{TNF}\alpha$, растворимый рецептор $\text{TNF}\alpha$, растворимый рецептор IL-1 (Анакинра) и антитела против IL-6R (Тоцилизумаб); таргетная терапия Т-клеток (CTLA4-Ig [Абатацепт]), В клеточно-таргетная терапия (анти-CD20 [Ритуксимаб]) и тому подобное. В качестве альтернативы также находят применение противовоспалительные цитокины, такие как интерферон бета ($\text{IFN}\beta$)-1b (Бетаферон/Бетасерон). Но, хотя эти методы лечения являются более целенаправленными, по-прежнему наблюдается подавление иммунитета целого класса реакций, а не конкретно нежелательной реакции.

Таким образом, перспектива высокоселективной антигенспецифической терапии остается заманчивой, хотя и неуловимой. Такая специфичность потенциально могла бы обеспечить эффективное лечение нежелательных иммунных реакций без включения целых популяций иммунной системы или реакций. Но, несмотря на известные аутоантигенные мишени; сильную корреляцию многих аутоиммунных заболеваний со специфическими аллелями основного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II; и хорошо установленное вовлечение Т-клеток, антиген-таргетная терапия не была легко переведена на клиническое применение.

Разработка методов лечения для этой цели предусмотрена в настоящем документе.

Резюме

Композиции и способы предусмотрены для выделения, манипулирования и использования в терапевтических и других целях антигенспецифичных регуляторных Т-клеток млекопитающих, ограниченных МНС класса I, антигенспецифичных регуляторных Т-клеток. Регуляторные Т-клетки могут быть охарактеризованы как CD8^+ клетки, которые специфически подавляют реакции самореактивных и/или патогенных CD4^+ Т-клеток посредством цитотоксических механизмов, включая, без ограничения, перфорин, другие компоненты пути апоптоза перфорина/гранзима и т.д. Регуляторные Т-клетки являются антигенспецифичными, но не активируются тем же антигеном, что и самореактивные и/или патогенные CD4^+ Т-клетки. Показано, что это новое регуляторное подмножество CD8^+ Т-клеток присутствует у людей с активностью подавления патогенных CD4^+ Т-клеток, возникающих в результате самореактивности при аутоиммунных расстройствах или перекрестной реактивности к аутоантигенам при инфекционных заболеваниях посредством цитотоксичности. Регуляторные Т-клетки экспрессируют цитотоксические молекулы и, как было показано, вызывают запрограммированную гибель клеток самореактивных CD4^+ Т-клеток. Способность антиген-специфичных регуляторных клеток избирательно нацеливаться на специфические активированные CD4^+ клетки обеспечивает средство для высокоселективного лечения воспалительных заболеваний, например, аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, диабет I типа; системная красная волчанка, отторжение трансплантата; atopические состояния и тому подобное, и, таким образом, является весьма желательным методом лечения.

Показано, что во время развития ответа Т-клеток на иницирующий антиген происходит расширение (экспансия) CD4^+ Т-клеток, специфичных для иницирующего антигена, в течение периода от примерно 1 до примерно 3 недель; с сопутствующим расширением регуляторных CD8^+ клеток, которые могут специфически подавлять эти CD4^+ клетки. Расширение соответствующих популяций Т-клеток наблюдается в периферической крови и в соответствующих тканях для заболевания, таких как синовиальная ткань, ЦНС, участки аутоиммунных поражений и тому подобное.

Иницирующие антигены могут включать, без ограничения, аутоантигены, участвующие в развитии заболевания, включая известные аутоантигены, такие как миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин (MOG), основной белок миелина (MBP), аквапорин, декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAD), инсулин и проинсулин, матриксная металлопротеаза-1 (MMP-1), тип II коллаген (COLII), тиреоглобулин, протеолипидный белок (PLP), миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG), хондроцитарный гликопротеин, белки теплового шока (HSP), цитруллинированные белки, такие как филаггрин и т.д. Иницирующие антигены могут также включать неавтоантигены, включая, например, неавтоантигены, которые запускают аутоиммунные реакции; антигены, присутствующие на трансплантированных тканях, патогенные антигены, включая, например, вирусные антигены, такие как белки SARS-CoV-2, бактериальные антигены, включая Боррелии и т.д.

Регуляторные Т-клетки характеризуются фенотипом CD8^+ и МНС класса I с ограниченным. У людей

регуляторные Т-клетки экспрессируют ингибирующие белки KIR, а у мышей экспрессируют мышинный аналог, белки Ly49. Специфические белки KIR, экспрессируемые клетками, могут включать один или более ингибирующих белков KIR, например, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2; и могут конкретно включать один или более из KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR3DL1. Регуляторные Т-клетки также могут быть охарактеризованы как CD44⁺, CD 122⁺ и не ограничены Qa-1b. При рассеянном склерозе регуляторные клетки могут быть самонаводящимися в мозг, с фенотипом CD8 CD38⁺ HLA-DR⁺ KIR⁺ CD29⁺. Аффинные агенты, специфичные для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, могут быть использованы для обнаружения и изоляции регуляторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения нежелательных воспалительных состояний, опосредованных Т-клетками, которые могут включать, без ограничения, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата и т.д. Способы лечения предусматривают антигенспецифическое подавление специфических патогенных CD4⁺ Т-клеток цитотоксическими механизмами. В некоторых вариантах индивидууму предоставляется эффективная доза регуляторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки являются аутологичными для индивидуума, которого лечат. В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки являются аллогенными для индивидуума, которого лечат. В других вариантах индивидууму вводят эффективную дозу регуляторного пептида, который вызывает регуляторный пептид, специфичный для антигена, регуляторный ответ. Пептид может вводиться в подходящем формате, например, в комплексе с антигенпредставляющими клетками, в виде мультимера, в виде свободного пептида и т.д.

Лечение может быть назначено при появлении симптомов заболевания. Лечение может быть назначено в начале рецидива заболевания, на пике рецидива заболевания и т.д. Лечение может проводиться в комбинации с дополнительным средством, например, терапией, модифицирующей заболевание, например, интерфероном бета, ацетатом глатирамера, терифлуномидом, диметилфумаратом, финголимодом, натализумабом, окрелизумабом, алемтузумабом, кладрибином, митоксантроном и тому подобным. Дополнительный агент(ы) может вводиться одновременно, в шахматном порядке, после антигенспецифической терапии и т.д.

В определенных вариантах осуществления лечение направлено на аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой демиелинизирующее заболевание, например, рассеянный склероз, оптический нейромиелит и т.д. В некоторых вариантах осуществления воспалительное состояние инициируется аутоантигеном. В некоторых вариантах осуществления инициирующий аутоантиген представляет собой пептид белка, связанного с миелином, например, MOG, MBP, MAG и т.д. В других вариантах осуществления воспалительное состояние инициируется инфекцией, например вирусной инфекцией.

Например, у пациентов с COVID-19, которые могут страдать от серьезных клинических проблем, указывающих на аутоиммунитет, наблюдается повышенный уровень KIR + CD8⁺ Т-клеток, коррелирующий с тяжестью заболевания и началом васкулита, что позволяет предположить, что многие осложнения COVID-19 являются результатом различных типов аутоиммунитета.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы определения антигенной специфичности регуляторных Т-клеток, обеспечивая тем самым идентификацию регуляторных пептидных последовательностей. В одном таком способе рецепторы Т-клеток (TCR) антигенспецифичных регуляторных Т-клеток, например, $\alpha\beta$ Пара TCR, выражаются в виде растворимого мультимера, например, в виде тетрамера. Мультимер TCR используется в анализе связывания с библиотекой разнообразных пептидов в контексте МНС, например, в системе отображения дрожжей. Особый интерес представляет использование белков МНС человека, связанных с воспалительными заболеваниями. После одного или нескольких циклов связывания и отбора обогащенная пептидная последовательность обеспечивает идентификацию антигенной специфичности регуляторной Т-клетки. Идентифицированный таким образом пептидный антиген может быть нативным пептидом; или может быть суррогатным пептидом, который действует, специфически активируя представляющие интерес регуляторные Т-клетки.

В соответствующем варианте осуществления предусмотрены пептидные антигены, которые специфически связываются с регуляторными Т-клетками и активируют их, и пептиды которых могут быть идентифицированы способами, описанными здесь. Особенностью регуляторных пептидов является то, что они активируют регуляторные Т-клетки к антигену и ограниченному классу МНС I, анти-Т-клеточному ответу. Другими словами, регуляторные Т-клетки активируются регуляторным пептидом до состояния, при котором регуляторные Т-клетки будут подавлять реакции самореактивных и/или патогенных CD4⁺ Т-клеток посредством цитотоксических механизмов.

Композиции регуляторных пептидов могут быть фармацевтическими композициями, содержащими фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, где пептиды находятся в форме, которая подходит для активации Т-клеток. В некоторых из таких вариантов осуществления предусмотрена упаковка, содержащая средство против CD49e и одно или более вторых терапевтических соединений, а также вкладыш или этикетку на упаковке, которая указывает, что средство против CD49e должно вводиться в комбинации со вторым соединением пациенту для лечения неврологической воспалительной болезни.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивается изолированная популяция антигенспеци-

фичных, ограниченных МНС класса I CD8⁺ регуляторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки активируются в естественных условиях после введения иницирующего антигена индивидууму и выделяются из образца индивидуума, например, периферической крови, лимфатического узла и т.д. В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки активируются в системе культивирования искусственно после введения иницирующего антигена. В других вариантах осуществления Т-клетки активируются искусственно путем контакта с регуляторным пептидом, например, в совместной культуре с подходящими антигенпредставляющими клетками. В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, независимо от того, активированы ли они первоначально в естественных условиях или искусственно, размножаются в системе культивирования искусственно, например в среде, содержащей один или более подходящих цитокинов для размножения, включая, без ограничения, IL-15, IL-1, IL-18, IL-33 и т.д.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки экспрессируют сконструированный рецептор Т-клеток со специфичностью к регуляторному пептиду. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от индивидуума, подлежащего лечению, и конструируют искусственно для экспрессии TCR, специфичного для регуляторного пептида в контексте МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от индивидуума в период экспансии после иммунного вызова, например, после вакцинации. В других вариантах осуществления регуляторные Т-клетки являются аллогенными по отношению к индивидууму, которого лечат.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы для анализа воспалительного, включая инфекционное заболевание, включая, без ограничений, вирусную инфекцию, такую как SARS-CoV-2, у индивидуума способ, включающий обнаружение присутствия или обнаружение изменений уровней регуляторных CD8⁺ Т-клеток, в частности CD8⁺KIR⁺ Т-клеток. Способы могут включать, например, обнаружение с помощью проточной цитометрии, массовой цитометрии и т.д. присутствия CD8⁺KIR⁺ клеток в образце пациента или во временном ряду образцов пациента, например, после терапевтического лечения, во время вспышки заболевания и т.д. Клетки могут быть более конкретно охарактеризованы экспрессией специфических белков KIR, включая, без ограничений, один или более KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2; и может конкретно включать один или несколько KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR3DL1. Клетки могут дополнительно характеризоваться экспрессией маркеров, включая, без ограничений, CD38, HLA-DR, CD29, CD44, CD122 и т.д. Клетки также могут быть охарактеризованы для экспрессии TCR, связанного с регуляторными Т-клетками, например, путем связывания полипептида мультимерного пептида/МНС. Наличие повышенных уровней регуляторных Т-клеток может быть связано с улучшением прогноза заболевания, хотя при вирусном заболевании может свидетельствовать о наличии аутоиммунных связанных осложнений. Пациенты могут лечиться в соответствии с прогнозом, методами лечения, описанными в настоящем описании, или обычными способами лечения. Анализ может также оценить образец пациента на наличие, например, расширения, патогенных CD4⁺ Т-клеток, специфичных для аутоантигена и т.д.; для расширения $\gamma\delta$ Т-клеток и тому подобное.

Краткое описание чертежей

Изобретение лучше всего понимать из следующего подробного описания при чтении в сочетании с сопроводительными чертежами. Подчеркивается, что согласно общепринятой практике различные особенности чертежей не являются масштабными. Напротив, размеры различных объектов произвольно расширяются или уменьшаются для ясности.

Фиг. 1: Сопутствующая активация всех Т-клеток после иммунизации ЭАЕ. мышей C57BL/6J иммунизировали для индукции ЕАЕ. а) Клетки из крови, ЦНС, селезенки и дренирующих LN были выделены и проанализированы на общую частоту Т-клеток в разные дни после иммунизации (PI). b-e) Общая частота CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток в крови (b), ЦНС (c), LN (d) в селезенке (e) в разные дни после иммунизации (D0 (неиммунизированный) (n = 5), D3 (n = 4), D5 (n = 4), D7 (n = 4), D10 (n = 4), D12 (n = 4), D15 (n = 5), D17 (n = 5), D19 (n = 5), D21 (n = 5), D23 (n = 5) и D30 (n = 3)). Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов. *P = 0,05; **P = 0,0097; ***P = 0,0008; ****P < 0,0001; односторонний дисперсионный анализ (ANOVA), за которым следует пост-специальный множественный сравнительный тест Даннетта.

Фиг. 2: CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетки клонально расширяются после eaE. а, b) C57BL/6J мышей иммунизировали для индукции ЕАЕ (а), а в разные дни после иммунизации (D0 (неиммунизированный), D7, D10, D15 и D19) крови и ЦНС-инфигнирующих CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетки были отсортированы по одноклеточным FACS-маркерам активации (CD44^{hi} CD62L^{low}.) и их TCR были упорядочены (b). CFA, полный адьювант Фройнда; PTX, коклюшный токсин. c, d) Круговая диаграмма, изображающая клональное расширение CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток в разные дни после иммунизации в крови (c) и ЦНС (d). Каждая круговая диаграмма представляет собой совокупность количества последовательностей TCR от трех отдельных мышей, объединенных вместе за точку времени на ткань. Количество успешно идентифицированных ячеек с β или обеими цепочками γ и δ показано над каждой круговой диаграммой. Для каждого клона TCR, экспрессируемого двумя или более клетками (клонально расширенными), абсолютное количество клеток, экспрессирующих этот клон, показано отдельным цветным сечением. Данные

секвенирования взяты из одного эксперимента, состоящего из трех отдельных мышей в каждый момент времени.

Фиг. 3: Клонально расширенные CD8 TCR не реагируют на миелин. a-d) Четыре клонально расширенных CD4 TCR (EAE1-CD4 (a), EAE2-CD4 (b), EAE3-CD4 (a) и EAE4-CD4 (d)) были экспрессированы на клетках SKW $\alpha\beta^{-/-}$ и окрашены MOG35₅₅ и ovalbumin 327-337 (OVA₃₂₇) I-Ab pMHC tetramer. e, Девять клонально расширенных CD8 TCR (EAE1-CD8 до EAE9-CD8) были выражены на 58 $\alpha\beta^{-/-}$ клетки. Клетки стимулировали пулами миелиновых пептидов из MOG, основного белка миелина (MBP), протеолипидного белка (PLP), миелиноассоциированного гликопротеина (MAG), SIINFEKL, белка миелина или овальбумина, а также анти-CD3 и анти-CD28 в течение 12-16 ч, и исследовали на экспрессию маркера активации CD69. Каждый пул пептидов (PP1-PP7) состоял из пептидов переменной длины (8-12 нуклеотидов), и каждый пул пептидов содержал 50 пептидов. 58 $\alpha\beta^{-/-}$ клеток, экспрессирующих OT-1 TCR, стимулировали либо пептидом SIINFEKL, либо белком овальбумина. Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

Фиг. 4: Клонально расширенные EAE CD8 TCR связываются с новыми пептидами, a-c, тетрамерное окрашивание 9-нуклеотида и 10-нуклеотида H2-Db дрожжей-pMHC с библиотекой 6218 TCR (a), EAE6-CD8 TCR (b) и EAE7-CD8 TCR (c) в конце трех раундов отбора. (d-f) Тепловые карты предпочтения аминокислот по положению для 6218 (слева) (d), EAE6-CD8 (в центре) (e) и EAE7-CD8 (справа) (f) TCR после трех раундов отбора. Последовательности семи лучших пептидов после трех раундов отбора для каждого TCR показаны ниже с его аминокислотным предпочтением. Анкерные остатки MHC окрашены в красный цвет (P5, Asn; N) или синий (P9/10, Met, Ile и Leu; M/I/L). Каждый TCR был экранирован в библиотеке дрожжей один раз.

Фиг. 5: CD8⁺ Т-клеточная иммунизация SP отменяет EAE. a, b) Селезенку и LN-клетки были выделены из неиммунизированных мышей и мышей через 10 дней после иммунизации, и клетки были обогащены cd4⁺ Т-клетками, специфичными для I-Ab MOG35-55 (a) или для CD8⁺ Т-клеток, специфичных для SP (SMRPNHFFFL, ASRSNRYFWL, HDRVNWEYI и YQPGNWEYI) (b). Репрезентативные точечные графики показаны для неиммунизированных и иммунизированных мышей. Репрезентативные данные взяты из двух независимых экспериментов, c) показана частота CD4⁺ Т-клеток, специфичных для MOG35-55 среди мышей дикого типа (n = 4) и иммунизированных (n = 5 мышей). Данные являются средними \pm s.e.m. d) Частота SP-специфических CD8⁺ Т-клеток среди диких (n = 4) и различных групп иммунизации (n = 5 мышей на группу). Данные являются средними \pm s.e.m. e) Клинические показатели EAE среди мышей C57BL/6J, иммунизированных эмульсией, содержащей MOG35-55 плюс CFA и PTX (n = 10), или MOG35-55 плюс CFA, PTX и SP (n = 10), или только SP, CFA и PTX (n = 10). f) Клинические показатели EAE среди мышей C57BL/6J, иммунизированных MOG35-55 плюс CFA и PTX (n = 10), а затем оспаривается SP, ICFA и PTX через семь дней после иммунизации (n = 10). g) Клинические показатели EAE среди мышей C57BL/6J, иммунизированных SP, CFA и PTX, а затем оспариваемых MOG35-55 плюс ICFA и PTX через семь дней после иммунизации (n = 10). Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов. **P = 0,0040, ****P < 0,0001, регрессионный анализ с двусторонней ANOVA, за которым следует пост-специальный множественный сравнительный тест Бонферрони.

Фиг. 6: CD8⁺ Т-клеточная специфическая иммунизация SP подавляет MOG35-55 специфические CD4⁺ Т-клетки. a, b, C57BL/6J мышей иммунизировали эмульсией, содержащей MOG35-55, CFA и PTX, c (n = 4) или без (n = 5) SP. a) Клетки селезенки и LN были выделены из неиммунизированных (n = 4) и D10 постиммунизированных (n = 5 мышей на группу), и обогащены для MOG35-55 I-Ab pMHC-специфических CD4⁺ Т-клеток. Показаны точечные графики FACS от репрезентативных мышей из разных групп. b) Частота MOG35-55-специфических CD4⁺ Т-клеток из каждой группы. Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов, (c, d), C57BL/6J мышей иммунизировали как у a и b c (n = 2 мыши) или без (n = 2 мыши) SP, а изолированные клетки селезенки и LN от неиммунизированных (n = 2) и D10 постиммунизированных мышей были обогащены CD4⁺, CD8⁺ Т-клетками или антигенпрезентирующими клетками (APC). Меченые красителем CD4⁺ Т-клетки у мышей, иммунизированных MOG, культивировали совместно с APC у MOG-иммунизированных мышей в отсутствие (c) или присутствии (d) CD8⁺ Т-клеток у мышей, иммунизированных только MOG, MOG и SP или SP. Клетки анализировали на пролиферацию через 7 дней после кокультуры. Репрезентативные данные двух независимых экспериментов, (e) частота CD8⁺ Т-клеток с регуляторным фенотипом (CD44⁺CD122⁺Ly49⁺) показана среди групп дикого типа (n = 4) и различных групп иммунизации (n = 5 мышей на группу). Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов. *P = 0,0382; ***P = 0,001; односторонняя ANOVA, за которой последовал пост-специальный множественный сравнительный тест Туки, f-h, CD4⁺ Т-клетки у мышей, иммунизированных MOG, были совместно культивированы без (f) или с общим количеством CD8⁺ Т-клеток (g) или с очищенными CD8⁺ CD44⁺ CD122⁺ Ly49⁺ (Ly49⁺) (h) или CD8⁺ CD44⁺ CD122⁺ Ly49⁺ (Ly49⁺) (i) Т-клетки мышей, иммунизированных MOG и SP (n = 2 мыши на группу). Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов. j) Тепловая карта экспрессии генов в образцах RNA-seq. Гены бы-

ли отобраны на основе того, что они дифференциально экспрессированы (\log_2 -преобразованное изменение складки $> 0,75$ и скорректированное $P < 0,005$; идвуххвостый Бенджамини-Хохберг, скорректированный $P < 0,005$), как определено DESeq2 в обоих $Ly49^+$ против $Ly49^+$ и сравнение MOG и MOG плюс SP. Столбцы показывают образцы; строки и столбцы упорядочены на основе иерархической кластеризации. Нормализованные значения экспрессии генов центрируются для каждого гена путем вычитания среднего значения всех образцов из каждого значения образца. Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов.

Фиг. 7: Массивное клональное расширение всех Т-клеток после иммунизации ЭАЕ. Мышей a-e, C57BL/6J иммунизировали для индукции ЭАЕ, а клетки из крови, дренирующие LN, селезенку и ЦНС, выделяли и окрашивали коктейлем из клеточно-поверхностных антител в разные дни после иммунизации (D0 (неиммунизированные), D3, D5, D7, D10, D12, D15, D17, D19, D21, D23 и D3). а) Инфильтрирующие $CD4^+$, $CD8^+$ и $\dot{\gamma}^+$ Т-клетки были отсортированы по D0 (неиммунизированные), D7, D10, D15 и D19 после иммунизации. Клетки подверглись одноклеточному парному секвенированию TCR. ($n = 3$ мыши на группу/точку времени). В общей сложности мы секвенировали 1,302 ($CD4^+$), 1,660 ($CD8^+$) и 1,451 ($\dot{\gamma}^+$) парных последовательностей TCR. b-d) Средний процент клональной экспансии $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) и $\dot{\gamma}^+$ (d) Т-клеток среди неиммунизированных и иммунизированных мышей во все дни и ткани вместе взяты. Данные являются средними \pm t.e.m. д) Процент идентичных последовательностей $CD4^+$, $CD8^+$ и $\dot{\gamma}^+$ TCR, разделяемых между кровью и ЦНС в течение каждого дня после иммунизации. f) Частота основных групп (группы 1-4) клеток, полученных из тимуса $\dot{\gamma}^+$ T17 (tT $\dot{\gamma}^+$ 17) в крови и ЦНС в разные дни после иммунизации, например, Соответствующие парные TCR $\dot{\gamma}$ и TCR $\dot{\delta}$ последовательности, определяющие каждую основную группу (группы 1-4) клеток tT $\dot{\gamma}^+$ 17.

Фиг. 8: Сопутствующая активация всех Т-клеток после иммунизации ЭАЕ и клонально расширенных CD8 TCR не специфичны для пептидов или белков миеллина, мышей a-f, C57BL/6J иммунизировали для индукции ЭАЕ, а клетки из крови, дренируя LN и селезенку, выделяли и анализировали на общую частоту активированных ($CD44^{high}$) (a, c, e) и наивных ($CD62L^{high}$) (b, d, f) $CD4^+$, $CD8^+$ клеток. Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов. * $P = 0,046$; ** $P = 0,0023$; *** $P = 0,0002$; **** $P < 0,0001$, односторонняя ANOVA, за которой последовал пост-специальный множественный сравнительный тест Даннетта. g) Девять клонально расширенных CD8 TCR (EAE1-CD8 до EAE9-CD8) были ретровирусно трансдуцированы для экспрессии на $58 \alpha\beta^{-/-}$ клетках. Нетрансдуцированные и трансдуцированные клеточные линии окрашивали мечеными фторхромом анти-TCR β и анти-CD3 для определения поверхностной экспрессии TCR. h) Нетрансдуцированные и трансдуцированные EAE-CD8 TCR клеточные линии стимулировали пластинчатым анти-CD3 и растворимым анти-CD28 в течение 12-16 ч и окрашивали поверхность маркером активации CD69. i) Нетрансдуцированные $58 \alpha\beta^{-/-}$ или OT-1 TCR трансдуцированные клеточные линии стимулировали BMDC, импульсными пептидом SIINFEKL или целым белком OVA в течение 12-16 ч, промывали и окрашивали CD69. j) Нестимулированные $58 \alpha\beta^{-/-}$ или EAE-CD8 TCR трансдуцированные клеточные линии стимулировали пулом пептидов (PP1-PP7) из пептидов MOG, MBP, PLP, MAG и SIINFEKL и исследовали на экспрессию CD69 (экспрессия CD69 показана на рисунке для EAE1-CD8 TCR). Пептиды имеют переменную длину (8-12 нуклеотидов). Каждый пептидный бассейн содержал 50 пептидов. Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

Фиг. 9: Генерация и функциональная валидация библиотеки дрожжевого пептида H2-Db-MHC. а) Схема мышиного класса I MHC H2-Db, отображаемого на дрожжах как β_2m , α_1 , α_2 и α_3 с пептидом, ковалентно связанным с конечной точкой MHC N. б) Дизайн пептидной библиотеки, отображаемой H2-Db. Конструкция основана на структуре 6218 TCR, связанного с H2-Db-ограниченным кислотным полимерным пептидом 224-233 (SSLENFRAYV, DbPA224) (присоединение PDB 3PQY). с) мутация, необходимая для правильного складывания H2-Db, отображаемого на дрожжах (α_2 -W131 до α_2 -G131). Мутации были получены из подверженного ошибкам мутагенеза; d) проектирование для двух библиотек H2-Db разной длины. Для библиотеки девяти аминокислот (9 MER) остатки от P1 до P9 были рандомизированы с ограниченным разнообразием в якорных позициях MHC P5 (Asn, N) и P9 (Met, Ile и Leu, M/I/L). Для библиотеки десяти аминокислот (10 MER) остатки от P1 до P10 были рандомизированы с ограниченным разнообразием в якорных позициях MHC P5 (Asn, N) и P10 (Met, Ile и Leu, M/I/L). Контактные остатки TCR окрашены в розовый цвет, а анкерные остатки MHC окрашены в красный или синий цвет. Например, Выбор библиотеки PA224-H2-Db, подверженной ошибкам, с растворимым TCR 6218. Повышенная экспрессия сMuc среди индуцированной библиотеки пептида дрожжей H2-Db, подверженной ошибкам, при различных раундах (RD1-RD4) отбора (например, g) и окрашивании тетрамера TCR 6218 на подверженной ошибкам библиотеке H2-Db (g) после RD4. Каждый TCR был экранирован в библиотеке дрожжей один раз.

Фиг. 10: Характеристика искусственной в естественных условиях $CD8^+$ Т-клеток, специфичных для суррогатных пептидов после ЭАЕ. а) Jurkat $\alpha\beta^{-/-}$ Т-клетки, экспрессирующие 6218, EAE6 и EAE7-CD8 TCR, были окрашены соответствующими тетрамерами pMHC, обогащенными дрожжевой библиотекой (SSLENFRAYV, ASRSNRYFWL, SMRPNHFFFL, YQPGNWEYI и HDRVNWEYI), соответственно; б) от

неиммунизированных мышей ($n = 4$) или мышей, иммунизированных MOG ($n = 5$), MOG + SP ($n = 5$) или SP ($n = 5$), клетки селезенки и LN были выделены, а клетки были обогащены для SP-специфических CD8⁺ Т-клеток тетрамерами рМНС. Показана репрезентативная стратегия гетирования проточной цитометрии для различных маркеров клеточной поверхности и тетрамер-специфических клеток; с) данные репрезентативной проточной цитометрии показаны для статуса активации (определяемого как CD44⁺CD62L⁻) на CD8⁺ Т-клетках, специфичных для SP (ASR, HDR, SMRP и YQP-tet⁺) из групп иммунизации дикого типа и различных групп иммунизации (MOG, MOG + SP и SP). d) Активированный/эффекторный фенотип CD8⁺ Т-клеток, специфичных для SP (ASR, HDR, SMRP и YQP-tet⁺) из дикого типа ($n = 5$) и различные группы иммунизации (MOG ($n = 3$), MOG + SP ($n = 4$) и SP ($n = 3$)) количественно оцениваются ($n = 5$ мышей на группу). *P = 0,0169; **P = 0,0020; ****P < 0,0001, односторонняя ANOVA, за которой следует пост-специальный множественный сравнительный тест Туки. Данные являются средними \pm s.e.m. e) C57BL/6J мышей иммунизировали для EAE эмульсией, содержащей MOG35-55, CFA плюс PTX с ($n = 10$) или без ($n = 10$) пептидом гриппа (SSLENFRAYV). Регистрировались клинические показатели после иммунизации. Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов.

Фиг. 11: CD8⁺ Т-клеточная специфическая иммунизация SP подавляет MOG35-55-специфические CD4⁺ Т-клетки и индуцирует CD8⁺ Т-клетки с регуляторным фенотипом, а-с, C57BL/6J мыши были иммунизированы эмульсией, содержащей MOG35-55, CFA и PTX ($n = 5$), или MOG35-55, CFA, PTX и SP ($n = 5$). Из неиммунизированных мышей (a) и мышей через 10 дней после иммунизации (b, c) клетки селезенки и LN были выделены, окрашены и обогащены для MOG35-55 I-Ab рМНС-специфических CD4⁺ Т-клеток и нерелевантного тетрамера. Показаны репрезентативные графики FACS для разных групп, d-g, клетки селезенки и LN были выделены у неиммунизированных мышей ($n = 5$) (d) и мышей через 10 дней после иммунизации MOG ($n = 5$) (g), MOG плюс SP ($n = 5$) (f) или SP в одиночку ($n = 4$) (e), а затем окрашены и обогащены для SP-специфических CD8⁺ Т-клеток с использованием тетрамера рМНС. Показаны репрезентативные точечные графики FACS для CD8⁺ Т-клеток с регуляторным фенотипом (CD44⁺CD122⁺Ly49⁺) из каждой группы, h, тетрамер-положительные (то есть ASR, HDR, SMRP и YQP-tet⁺) CD8⁺ Т-клетки были суб-закрыты для CD122, CD44 и Ly49, а частота CD122⁺CD44⁺Ly49⁺ клетки среди SP-специфических клеток показаны среди различных групп иммунизации. P = 0,0002, односторонняя ANOVA, за которой следует пост-специальный множественный сравнительный тест Туки. Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов.

Фиг. 12: CD8⁺ Т-клетки, полученные после иммунизации MOG + SP, специфичны, их подавление опосредовано перфорином, приемный перенос CD122⁺CD44⁺Ly49⁺ отменяет EAE, а SP вызывает более тяжелый, воспалительный увеит сетчатки, чем только пептид IRBP. a-g) C57BL/6J мыши были иммунизированы эмульсией, содержащей MOG35-55, CFA и PTX, MOG35-55, CFA, PTX и SP (b), или MOG35-55, CFA, PTX и пептид гриппа (e). Клетки селезенки и LN были выделены у мышей через 10 дней после иммунизации, а клетки были обогащены CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетками или АПК FACS. CD4⁺ Т-клетки у мышей, иммунизированных MOG, были помечены CTV и совместно культивированы с APC у мышей, иммунизированных MOG, в отсутствие (a) или в присутствии CD8⁺ Т-клеток от мышей дикого типа (c) или мышей, иммунизированных MOG плюс SP (b), CFA плюс PTX (d), MOG плюс пептид гриппа (e) или CD8⁺ Т-клеток от перфорин-нокаутных (PENKO) мышей, иммунизированных MOG плюс SP (f). g) Меченые CTV CD4⁺ Т-клетки от мышей, иммунизированных MOG35-55, CFA плюс PTX были совместно культивированы с CD8⁺ Т-клетками от мышей, иммунизированных MOG35-55, CFA, PTX плюс SP в присутствии антигена против Qa-1b (10 μ g ml⁻¹), h) меченые CTV CD4⁺ Т-клетки от мышей, иммунизированных OVA329-337, CFA плюс PTX были совместно культивированы с CD8⁺ Т-клетками у мышей, иммунизированных MOG35-55, CFA, PTX плюс SP. Через семь дней после совместной культивирования клетки промывали и окрашивали поверхностными маркерами и анализировали на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток (разбавление CTV).

Репрезентативные данные взяты из двух независимых экспериментов, i, C57BL/6J мышей иммунизировали MOG35-55, CFA, PTX plus SP ($n = 10$) и через 10 дней после иммунизации клетки селезенки и LN были выделены, окрашены и обогащены для CD8⁺Т-клеток, а затем FACS для клеток Ly49⁺ и Ly49⁻. Отсортированные клетки Ly49⁺ и Ly49⁻ были адаптированы (8 млн клеток на мышью) мышам C57BL/6J ($n = 5$ мышей на группу) во время иммунизации. Показаны клинические баллы после усыновления и иммунизации. P < 0,0001, регрессионный анализ с двусторонней ANOVA, за которой следует пост-специальный множественный сравнительный тест Бонферрони. Данные являются средними \pm s.e.m. и репрезентативными для двух независимых экспериментов; j) В необработанном мышинном глазу дикого типа сетчатка показывает нормальный ламинарный рисунок, и в стекловидном теле нет лейкоцитов: k) После подкожной инъекции пептидного антигена IRBP наблюдалась лишь легкая воспалительная реакция в 40% глаз с активированной лейкоцитарной инвазией стекловидного тела (красная стрелка) и легким нарушением фоторецепторов наружного ядерного слоя сетчатки (черная стрелка). l) После подкожной инъекции как IRBP, так и SP наблюдалась тяжелая воспалительная реакция в 80% глаз с активированной лейкоцитарной инвазией стекловидного тела (красные стрелки) и тяжелым нарушением работы

фоторецепторов сетчатки (черные стрелки). INL, внутренний ядерный слой; IPL, внутренний плексиформный слой; ONL, внешний ядерный слой; OPL, наружный плексиформный слой; RGC, ганглиозный клеточный слой сетчатки; РПЭ, плексиформный слой сетчатки. Пять мышей C57BL/6J были обследованы для каждого состояния. EAU был индуцирован, и мыши были усыплены на 21-й день после иммунизации. Мышинные глаза были энуклеированы, зафиксированы, а зрочно-зрительные нервные отделы были исследованы гистологией, m-o) C57BL/6J мышью иммунизировали IRBP, CFA и РТХ с ИЛИ без SP. Клетки селезенки и LN были выделены у мышей через 10 дней после иммунизации, а клетки были обогащены CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетками или APC с помощью FACS. Меченые CTV CD4⁺ Т-клетки от IRBP-иммунизированных мышей были совместно культивированы с APC от IRBP-иммунизированных мышей и очищены CD8⁺Ly49⁺ Т-клетками (n), CD8⁺Ly49-Т-клетками (o) или без CD8⁺ Т-клеток (m) у мышей, иммунизированных IRBP и SP. Через семь дней после совместной культивирования клетки промывали и окрашивали поверхностными маркерами и анализировали на CD4⁺; пролиферация Т-клеток.

Фиг. 13: Транскрипционное профилирование клеток Ly49⁺ и Ly49-. Мышей C57BL/6J иммунизировали SP, CFA и РТХ (n = 3). Клетки селезенки и LN были выделены у мышей D10 и обогащены для CD8⁺ Т-клеток с помощью FACS и сортировки для клеток Ly49- и Ly49⁺, с последующим объемным анализом РНК-seq. a) Тепловая карта дифференциально экспрессированных генов (log 2 - преобразованное изменение складки > 2 и скорректированная P < 0,005) в Ly49⁺/Ly49- Образцы РНК-с. Столбцы показывают образцы, а строки и столбцы упорядочены на основе иерархической кластеризации. Нормализованные значения экспрессии генов центрируются для каждого гена путем вычитания среднего значения всех образцов из каждого значения образца (2-3 мыши в группе). b, Анализ обогащения генов дифференциально экспрессированных генов (log 2- преобразованное изменение складки > 2 и двуххвостый Бенджамини-Хохберг, скорректированный P < 0,005 от DESeq2) между образцами Ly49⁺ и Ly49- РНК-seq. Ось y представляет собой топ-30 обогащенных генов онтологии (гены из генов онтологий, выделенные зеленым цветом, приведены в дополнительной табл. 6). Значение оси X - это доля генов в этой онтологии, которые дифференциально экспрессируются. Цвет точки представляет собой значение обогащения генов онтологии (точный тест Однохвостого Фишера), а размер точки представляет собой количество дифференциально экспрессируемых генов. График был сделан с помощью пакета R 'clusterProfiler'. c) График вулкана, представляющий различия в экспрессии генов между образцами Ly49⁺ и Ly49- (3 мыши в группе). Каждая точка - это ген. Список генов, специфически экспрессируемых в CD4⁺ Т-регуляторных клетках 25, окрашен в красный цвет, если они экспрессируются как в образцах MOG, так и в образцах SP RNA-seq, и зеленый, если нет. Горизонтальная пунктирная линия выполнена в -log₁₀(0,05), а две вертикальные пунктирные линии представляют собой сгибовое изменение log₂(2). Гены с отрицательным изменением складки высоко экспрессируются в клетках Ly49⁺.

Фиг. 14: Значительное клональное расширение CD8⁺ Т-клеток у пациентов с недавно начавшимся MS. a-c) BMC из здоровых контрольных групп (HC) (n = 4) и пациентов с РС (n = 18) были окрашены и проанализированы с помощью проточной цитометрии для определения частоты Т-клеток. Показана частота CD4⁺ (a), CD8⁺ (b) и $\gamma\delta$ ⁺ (c) Т-клеток. Данные являются средними \pm s.e.m. d, e) Самонаведение мозга и активированные (CD49d⁺ CD29⁺ HLA-D⁺ CD38⁺) CD8⁺ Т-клетки были отсортированы из NBMC здоровых контрольных групп (d) и недавно диагностированных пациентов с РС (e). Клетки подверглись одноклеточному парному секвенированию TCR. Круговые диаграммы, изображающие клональное расширение CD8⁺ Т-клеток среди здоровых контрольных групп (n = 10) и пациентов с РС (n = 18). Количество ячеек с успешно идентифицированной цепочкой β показано над круговой диаграммой. Для каждого клона TCR, экспрессируемого двумя или более клетками (клонально расширенными), абсолютное число клеток, экспрессирующих этот клон (≥ 2 , ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 20 и ≥ 50), показано отдельным цветным сечением.

Фиг. 15: Репертуар TCR мозговых самонаводящихся активированных CD4⁺ Т-клеток у пациентов с недавно начавшимся MS. a, b) самонаведением мозга и активированным (CD49d⁺ CD29⁺ HLA-DR⁺ CD38⁺) CD4⁺ Т-клетки были отсортированы от NPMC здоровых контрольных групп (a) и пациентов с недавно начавшимся РС (b). Клетки подверглись одноклеточному парному секвенированию TCR. Круговые диаграммы, изображающие клональное расширение CD4⁺ Т-клеток среди здоровых контрольных групп (n = 10) и пациентов с РС (n = 18). Количество ячеек с успешно идентифицированной цепочкой β показано над круговой диаграммой. Для каждого клона TCR, экспрессируемого двумя или более клетками (клонально расширенными), абсолютное число клеток, экспрессирующих этот клон (≥ 2 , ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 20 и ≥ 50), показано отдельным цветным сечением.

Фиг. 16: Репертуар TCR активированных мозгом $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток у пациентов с недавно начавшимся MS. a, b, самонаведением мозга и активированными (CD49d⁺ CD29⁺ HLA-DR⁺ CD38⁺) $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетки были одноклеточными, отсортированными от RBMCs здоровых контрольных групп (a) и пациентов с недавно начавшимся РС (b). Клетки подверглись одноклеточному парному секвенированию TCR. Круговые диаграммы, изображающие клональное расширение $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток среди здоровых контрольных групп и пациентов с РС. Количество ячеек с успешно идентифицированной цепочкой δ показано над круговой диаграммой. Для каждого клона TCR, экспрессируемого двумя или более клетками (клонально расширен-

ными), абсолютное число клеток, экспрессирующих этот клон (≥ 2 , ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 20 и ≥ 50), показано отдельным цветным сечением. Из одноклеточных отсортированных $\gamma\delta^+$ Т-клеток транскрипты орфанных рецепторов (ROR), связанные с RAR, амплифицировали с помощью ген-специфических праймеров и секвенировали одновременно с цепочками γ и δ . с, Количество $\gamma\delta^+$ Т-клеток, положительных для транскрипта RORC, показано среди здоровых контрольных групп (n = 10) и пациентов с РС (n = 18). *P = 0,0301, парный t-тест. Данные являются средними \pm s.e.m.

Фиг. 17: Частота KIR+ CD8+ Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях человека, а) Репрезентативные контурные графики (слева) и сводная гистограмма (справа), показывающие частоту KIR+ CD8+ Т-клеток (CD3+ CD56-) в периферической крови здоровых контрольных групп (НС, N = 16) и пациентов с системной красной волчанкой (СКВ, N = 22), рассеянным склерозом (MS, N = 10) или целиакией (CeD, N = 14), проанализированные с помощью проточной цитометрии. Клетки KIR+ были обнаружены PE-конъюгированными антителами против KIR2DL1 (клон #143211), KIR2DL2/L3 (Dx27), KIR2DL5 (UP-R1), KIR3DL1 (Dx9) и KIR3DL2 (клон#539304). *P<0,05, односторонняя ANOVA, скорректированная для многократных сравнений. б) Корреляция между частотой KIR+ CD8+ Т-клеток и аутоиммунных CD4+ Т-клеток (CD45RA-, CD62L-, PD-1+, CXCR3+, CD39+, CD38+, CD127-, CD25low, CD161+ и ICOS+ CD4+ Т-клеток) в крови пациентов с СКВ (N=11). R2 = 0,8479, P = 0,0002***. в) Показана экспрессия транскриптов KIR (KIR3DL1, KIR2DL3 и KIR2DL2) в CD8+ Т-клетках из контрольных здоровых почек по сравнению с почками нефрита СКВ. д) Экспрессия транскриптов KIR (KIR3DL1, KIR2DL3 и KIR2DL2) в синовиальных CD8+ Т-клетках и экспрессия FOXP3 в синовиальных CD4+ Т-клетках от ревматоидного артрита (РА) и остеоартрита (ОА) показаны.

Фиг. 18: Элиминация глиадин-специфических CD4+ Т-клеток с помощью KIR+ CD8+ Т-клеток. а) Экспериментальная схема. б) Репрезентативные контурные графики, показывающие связывание тетрамеров 715 CD4+ Т-клеток после обогащения колонками MACS и сводка количества глиадин-специфических CD4+ Т-клеток (связывание с тетрамерами HLA-DQ2.5 в комплексе с пептидами глиадина) на 1 миллион CD4+ Т-клеток на 6-й день (N=5). *P<0.05, **P<0.01, тест Фридмана скорректирован для многократных сравнений; в) Репрезентативные контурные графики и обобщенный точечный график, отображающий связывание Annexin V глиадин-специфических (тетрамер-положительных) CD4+ Т-клеток из культуры, собранной на 3-й день. **P<0.01, односторонняя ANOVA скорректирована для нескольких сравнений.

Фиг. 19: Увеличение KIR+CD8+ Т-клеток у пациентов с COVID-19. а) Частота аутоиммунных CD4+ Т-клеток (CD45RA-, CD62L-, PD-1+, CXCR3+, CD39+, CD38+, CD127-, CD25low, CD161+ и ICOS+ CD4+ Т-клетки) у здоровых взрослых (N=18) против пациентов с COVID-19 (N=54) (слева, *P<0,05, непарный Т-тест) и у здоровых взрослых против COVID-19 пациентов с легкими (N=23), умеренными (N=17) или тяжелыми (N=13) заболеваниями (справа, *P<0,05, **P<0,01, ****P<0.0001, односторонняя ANOVA скорректирована для многократных сравнений). б) Репрезентативные контурные графики и обобщенные диаграммы рассеяния, показывающие процент клеток KIR+ в CD8+ Т-клетках из крови здоровых контрольных групп и пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания, слева: ***P<0.001, непарный Т-тест; справа: *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001, односторонняя ANOVA с поправкой на многократные сравнения; в) Корреляция между частотой KIR+ CD8+ Т-клеток и аутоиммунных CD4+ Т-клеток в крови пациентов с COVID-19 (N=54). r = 0,2811, P = 0,0377 *. д) Частота аутоиммунных CD4+ Т-клеток, KIR+CD8+ Т-клетки и CD4+ Treg (CD25hi CD127low) в крови пациентов с COVID-19 с васкулитом или без него. *P<0,05, ****P<0.0001, непарный t-тест. е) Экспрессия транскриптов KIR (KIR3DL1, KIR3DL2, KIR2DL3 и KIR2DL1) в CD8+ Т-клетках из жидкости бронхоальвеолярного промывания здоровых контрольных групп и пациентов с COVID-19 с умеренным или тяжелым заболеванием.

Фиг. 20: Одноклеточный РНК-сек анализ KIR+ CD8+ Т-клеток в крови. а-в,

Одноклеточный анализ РНК-сек общих CD8+ Т-клеток из крови здоровых субъектов (N=10), пациентов с рассеянным склерозом (N=6) и пациентов с COVID-19 (N=25) по 10-кратной геномике. а) UMAP график 8 субпопуляций, идентифицированных неконтролируемой кластеризацией на основе экспрессии маркерных генов в каждом кластере; б) графики UMAP, показывающие распределение Т-клеток KIR+CD8+ (экспрессирующих транскрипты KIR3DL1, KIR3DL2, KIR2DL1 или KIR2DL3) и Т-клеток KIR-CD8+ от здоровых контрольных групп (НС), пациентов с РС и пациентов с COVID-19. в-е) KIR+ CD8+ Т-клетки в крови здоровых контрольных групп (N=10) и пациентов с РС (N=2), СКВ (N=6) и CeD (N=5) были отсортированы по одноклеточной РНК-сек с использованием протокола Smart-seq2 и проанализированы с использованием пакета R 'Seurat'. в) графики UMAP, показывающие KIR+ CD8+ Т-клетки, разделенные на 6 кластеров (верхние) и распределение расширенных (≥ 2 клеток, экспрессирующих один и тот же TCR) и нерасширенных (клетки, экспрессирующие уникальный TCR) клеток (нижние), д) показаны UMAP-графики KIR+ CD8+ Т-клеток из MS, SLE, CeD и НС, с расширенными и нерасширенными клетками, аннотированными различными цветами (расширенный: красный, нерасширенный: синий, другие заболевания: серый); е) Тепловая карта, показывающая экспрессию 10 лучших генов, дифференциально экспрессируемых в каждом кластере, с категориями каждой группы генов, аннотированными слева. ф) Представление роли KIR+CD8+ Т-клеток в аутоиммунных расстройствах и инфекциях:

KIR+CD8+ Т-клетки подавляют патогенные CD4+ Т-клетки, возникающие в результате самореактивности при аутоиммунных расстройствах или перекрестной реактивности к аутоантигенам при инфекционных заболеваниях посредством их цитолитической активности.

Подробное описание вариантов осуществления

Прежде чем описывать настоящие способы, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами, поскольку таковые, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая здесь, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Там, где предусмотрен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, до десятой части единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, охватывается изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Как используется здесь и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа "a", "и" и "the" включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, также могут быть использованы на практике или при испытании настоящего изобретения, в настоящее время описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ путем ссылки для раскрытия и описания методов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации.

Публикации, обсуждаемые здесь, предоставляются исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые, возможно, потребуется независимо подтвердить.

Общие методы молекулярной и клеточной биохимии можно найти в таких стандартных учебниках, как Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд. (Самбрук и др., Harbor Laboratory Press 2001); Краткие протоколы по молекулярной биологии, 4-е изд. (Ausubel и др. ред., Джон Уайли и сыновья 1999); Белковые методы (Боллаг и др., Джон Уайли и сыновья 1996); Невирусные векторы для генной терапии (Вагнер и др. ред., Академическая пресса 1999); Вирусные векторы (Kapliff & Loewy ред., Академическая пресса 1995); Руководство по методам иммунологии (под ред. И. Лэфковица, Academic Press 1997); и Культура клеток и тканей: Лабораторные процедуры в биотехнологии (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Реагенты, векторы для клонирования и наборы для генетических манипуляций, упомянутые в этом раскрытии, доступны у коммерческих поставщиков, таких как Bio-Rad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich и ClonTech.

Настоящие изобретения были описаны в терминах конкретных вариантов осуществления, найденных или предложенных настоящим изобретателем для включения предпочтительных режимов для практической реализации изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, что в свете настоящего раскрытия в конкретные примеры воплощений могут быть внесены многочисленные модификации и изменения, не выходя за рамки предполагаемого объема изобретения. Все такие изменения предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

Предложены композиции и способы, которые относятся к характеристике, использованию и манипулированию антигенспецифичными, ограниченными МНС класса I, CD8+ регуляторными Т-клетками.

Рассматриваемые методы могут быть использованы в профилактических или терапевтических целях. Используемый здесь термин "лечение" используется для обозначения как профилактики рецидивов, так и лечения ранее существовавших состояний. Например, профилактика аутоиммунного заболевания может быть достигнута путем введения агента до развития рецидива. "Лечение", используемое здесь, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания или симптома у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию или симптому, но еще не диагностирован как имеющий его; (б) подавление симптомом болезни, т.е. остановка его развития; или (с) облегчение симптома болезни, т.е. вызывание регресса болезни или симптома. Особый интерес представляет лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или улучшает клинические симптомы пациента.

"Ингибирование" возникновения расстройства означает либо уменьшение вероятности возникновения расстройства, либо полное предотвращение возникновения расстройства. Уменьшение тяжести рецидива должно означать, что клинические признаки, связанные с рецидивом, менее выражены при наличии терапии, чем при нелеченном заболевании. Как используется здесь, начало может относиться к рецидиву у пациента, у которого продолжается рецидивирующее ремиттирующее заболевание. Способы по

изобретению могут быть конкретно применены к пациентам, у которых было диагностировано воспалительное заболевание, включая, например, аутоиммунное заболевание. Лечение может быть направлено на лечение или уменьшение тяжести рецидивов, которые являются обострением ранее существовавшего состояния.

"Диагностика", как используется здесь, обычно включает определение восприимчивости субъекта к заболеванию или расстройству, определение того, страдает ли субъект в настоящее время заболеванием или расстройством, прогноз субъекта, пораженного заболеванием или расстройством (например, идентификация состояний заболевания, стадий заболевания или чувствительности к болезни к терапии) и использование терапметрии (например, мониторинг состояния субъекта для предоставления информации об эффекте или эффективности терапии).

Термин "биологический образец" охватывает различные типы образцов, полученных из организма, и может быть использован в диагностическом или мониторинговом анализе. Термин охватывает кровь, спинномозговую жидкость головного мозга и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы твердых тканей, такие как образец для биопсии или культуры тканей или клетки, полученные из них, и их потомство. Термин охватывает образцы, с которыми каким-либо образом манипулировали после их получения, например, путем обработки реагентами, солиubilизации или обогащения определенными компонентами. Термин охватывает клинический образец, а также включает клетки в культуре клеток, супернатанты клеток, лизаты клеток, сыворотку, плазму, биологические жидкости и образцы тканей.

Термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту млекопитающего, для которого желательны диагностика, лечение или терапия, например, люди, нечеловеческие приматы, мыши, крысы, морская свинка, кролик и т.д.

Термин "агент", используемый здесь, включает любое вещество, молекулу, элемент, соединение, сущность или их комбинацию. Он включает, но не ограничивается, например, белком, олигопептидом, малой органической молекулой, полисахаридом, полинуклеотидом и тому подобным. Это может быть натуральный продукт, синтетическое соединение, химическое соединение или комбинация двух или более веществ. Если не указано иное, термины "агент", "вещество" и "соединение" могут использоваться взаимозаменяемо.

"Подходящие условия" должны иметь значение, зависящее от контекста, в котором используется этот термин. То есть, когда используется в связи с антителом, термин должен означать условия, которые позволяют антителу связываться с соответствующим ему антигеном. При использовании в связи с контактом агента с ячейкой этот термин означает условия, которые позволяют агенту, способному сделать это, входить в ячейку и выполнять ее предназначенную функцию. В одном варианте осуществления термин "подходящие условия", используемый здесь, означает физиологические условия.

"Субъект" или "пациент" в контексте настоящих учений, как правило, является млекопитающим. Млекопитающие, отличные от людей, могут быть преимущественно использованы в качестве объектов, представляющих модели воспаления на животных. Субъект может быть мужчиной или женщиной.

Для "анализа" включает определение набора значений, связанных с образцом, путем измерения маркера (такого как, например, наличие или отсутствие маркера или уровней экспрессии составляющих) в образце и сравнение измерения с измерением в образце или наборе образцов от того же субъекта или другого контрольного субъекта(ы). В частности, маркеры клеточной поверхности настоящего изобретения могут быть проанализированы любым из различных традиционных способов, известных в данной области. "Анализ" может включать выполнение статистического анализа, чтобы, например, определить, является ли субъект реагирующим или не реагирующим на терапию (например, введение лечения регуляторным пептидом, как описано здесь).

"Фармацевтически приемлемый эксципиент", "фармацевтически приемлемый разбавитель", "фармацевтически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый адъювант" означают эксципиент, разбавитель, носитель и адъювант, которые полезны при приготовлении фармацевтической композиции, которые в целом безопасны, нетоксичны и не являются биологически или иным образом нежелательными, и включают эксципиент, разбавитель, носитель и адъювант, которые приемлемы для ветеринарного применения, а также для фармацевтического использования человеком. "Фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель, носитель и адъювант", используемый в описании и формуле изобретения, включает как один, так и более одного такого эксципиента, разбавителя, носителя и адъюванта.

Как используется в настоящем описании, "фармацевтическая композиция" предназначена для охвата композиции, пригодной для введения субъекту, такому как млекопитающее, особенно человеку. В целом "фармацевтическая композиция" является стерильной и предпочтительно свободной от загрязняющих веществ, которые способны вызывать нежелательный ответ у субъекта (например, соединение (соединения) в фармацевтической композиции является фармацевтическим классом). Фармацевтические композиции могут быть разработаны для введения субъектам или пациентам, нуждающимся в них, через ряд различных способов введения, включая пероральный, буккальный, ректальный, парентеральный, внутрибрюшинный, внутрикожный, внутривенный, внутримышечный, подкожный и тому подобное.

"Единица дозирования" относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единых доз для конкретного индивидуума, подлежащего лечению. Каждая единица может содержать зара-

нее определенное количество активного соединения (ов), рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта (ов) в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для форм дозированных единиц может быть продиктована (а) уникальными характеристиками активного соединения (ов) и конкретным терапевтическим эффектом (эффектами), который должен быть достигнут, и (б) ограничениями, присущими уровню техники составления такого активного соединения (ов).

"Фармацевтически приемлемый наполнитель" означает наполнитель, который полезен при получении фармацевтической композиции, которая, как правило, безопасна, нетоксична и желательна, и включает наполнители, которые приемлемы для ветеринарного применения, а также для фармацевтического применения для человека. Такие вспомогательные вещества могут быть твердыми, жидкими, полутвердыми или, в случае аэрозольной композиции, газообразными.

"Фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры" означают соли и сложные эфиры, которые являются фармацевтически приемлемыми и обладают желаемыми фармакологическими свойствами. Такие соли включают соли, которые могут образовываться там, где кислые протоны, присутствующие в соединениях, способны вступать в реакцию с неорганическими или органическими основаниями. Подходящие неорганические соли включают соли, образованные щелочными металлами, например, натрием и калием, магнием, кальцием и алюминием. Подходящие органические соли включают соли, образованные органическими основаниями, такими как аминокислоты, например, этаноламин, диэтиламин, триэтиламин, триметамин, N-метилглюкамин и тому подобное. Такие соли также включают соли с добавлением кислот, образованные неорганическими кислотами (например, соляной и бромистоводородной кислотами) и органическими кислотами (например, уксусной кислотой, лимонной кислотой, малеиновой кислотой и алкановыми и аренсульфоновыми кислотами, такими как метансульфоновая кислота и бензолсульфоновая кислота). Фармацевтически приемлемые сложные эфиры включают сложные эфиры, образованные из карбокси, сульфоноксиды и фосфоноксигрупп, присутствующих в соединениях, например, алкиловые эфиры C1-6. Когда присутствуют две кислотные группы, фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир может быть монокислотно-моносольевым или сложным эфиром или ди-солью или сложным эфиром; и аналогично, когда присутствует более двух кислых групп, некоторые или все такие группы могут быть засолены или этерифицированы. Соединения, названные в этом изобретении, могут присутствовать в несалифицированной или неэтерифицированной форме или в засоленной и/или этерифицированной форме, и наименование таких соединений предназначено для включения как исходного (несалифицированного и неэтерифицированного) соединения, так и его фармацевтически приемлемых солей и сложных эфиров. Кроме того, некоторые соединения, названные в этом изобретении, могут присутствовать более чем в одной стереоизомерной форме, и наименование таких соединений предназначено для включения всех отдельных стереоизомеров и всех смесей (будь то рацемических или иных) таких стереоизомеров.

Термины "фармацевтически приемлемый", "физиологически переносимый" и их грамматические варианты, поскольку они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, используются взаимозаменяемо и представляют, что материалы способны вводиться человеку или на человека без возникновения нежелательных физиологических эффектов до степени, которая запрещала бы введение композиции.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество, которое при введении субъекту для лечения заболевания является достаточным для осуществления лечения этого заболевания.

Используемый здесь термин "в комбинации" относится к применению более чем одного профилактического и/или терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором профилактические и/или терапевтические агенты вводят субъекту с расстройством. Первое профилактическое или терапевтическое средство может быть введено до (например, 5, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель до), одновременно с или после (например 5, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 недель или через 12 недель после) введения второго профилактического или терапевтического средства субъекту с расстройством.

Болезненные состояния

В некоторых вариантах осуществления способы изобретения включают лечение, выделение клеточных популяций или диагностирование индивидуумов, "подверженных риску" развития или находящихся на "ранних стадиях" воспалительного заболевания. "Подверженный риску" развития воспалительного заболевания включает: (1) лиц, подверженных повышенному риску развития воспалительного заболевания, и (2) лиц, у которых наблюдается "доклиническое" состояние заболевания, но они не соответствуют диагностическим критериям воспалительного заболевания (и, следовательно, формально не являются считаемыми, что у него воспалительное заболевание).

Лица, "подверженные повышенному риску" развития (также называемые "подверженными риску" развития) воспалительного заболевания, - это лица с более высокой вероятностью развития воспалительного заболевания или заболевания, связанного с воспалением, по сравнению с населением в целом. Такие индивидуумы могут быть идентифицированы на основании их проявления или наличия одного или нескольких из следующих признаков: семейный анамнез воспалительного заболевания; наличие определенных генетических вариантов (генов) или комбинаций генетических вариантов, которые предраспола-

гают индивидуума к такому воспалительному заболеванию; наличие физических результатов, результатов лабораторных тестов, результатов визуализации, результатов теста на маркеры (также называемых результатами теста "биомаркер"), связанных с развитием воспалительного заболевания, или результатов теста на маркеры, связанных с развитием метаболического заболевания; наличие клинических признаков, связанных с воспалительным заболеванием; наличие определенных симптомов, связанные с воспалительным заболеванием (хотя индивидуум часто протекает бессимптомно); наличие маркеров (также называемых "биомаркерами") воспаления; и другие результаты, указывающие на то, что у человека в течение жизни повышается вероятность развития воспалительного заболевания или заболевания, связанного с воспалением. Большинство людей с повышенным риском развития воспалительного заболевания или заболевания, связанного с воспалением, протекают бессимптомно и не испытывают никаких симптомов, связанных с заболеванием, развитию которого они подвергаются повышенному риску.

В группу лиц с повышенным риском развития воспалительного заболевания или заболевания, связанного с воспалением, включены лица, демонстрирующие "доклиническое болезненное состояние". Состояние до заболевания может быть диагностировано на основе развивающихся симптомов, физических результатов, результатов лабораторных тестов, результатов визуализации и других результатов, которые приводят к тому, что человек соответствует диагностическим критериям воспалительного заболевания и, таким образом, официально диагностируется. Лица с "доклиническим заболеванием" демонстрируют результаты, которые предполагают, что человек находится в процессе развития воспалительного заболевания, но не демонстрируют результатов, включая симптомы, клинические данные, лабораторные данные и / или результаты визуализации и т.д., которые необходимы для удовлетворения диагностических критериев для формального диагноза воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления лица, демонстрирующие доклиническое болезненное состояние, обладают генетическим вариантом или комбинацией генетических вариантов, которые подвергают их повышенному риску развития заболевания по сравнению с лицами, которые не обладают этим генетическим вариантом или этой комбинацией генетических вариантов. В некоторых вариантах осуществления эти люди имеют лабораторные результаты, или физические результаты, или симптомы, или результаты визуализации, которые подвергают их повышенному риску развития воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления лица доклинические болезненные состояния переносят бессимптомно. В некоторых вариантах осуществления лица с доклиническими болезненными состояниями демонстрируют повышенные или пониженные уровни экспрессии определенных генов, определенных белков, воспалительных маркеров, метаболических маркеров и других маркеров.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение направлено на лечение лиц с установленным воспалительным заболеванием или заболеванием, связанным с воспалением. Воспалительное заболевание может быть диагностировано на основе отдельных симптомов, признаков, клинических особенностей, результатов лабораторных тестов, результатов теста визуализации, результатов биомаркеров и других результатов, которые позволяют врачу официально диагностировать у этого человека воспалительное заболевание, результаты которого могут включать специфическое расширение заболевания, вызывающего CD4⁺ Т-клетки, расширение $\gamma\delta$ Т-клетки и сопутствующее расширение регуляторных CD8⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления установленное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание, для которого у индивидуума был официальный диагноз заболевания, поставленный врачом в течение более 6 месяцев. При установленном воспалительном заболевании признаки и симптомы заболевания могут быть более серьезными по сравнению, например, с симптомами у человека, у которого диагностировано воспалительное заболевание на ранней стадии. При установленном воспалительном заболевании болезненный процесс может привести к повреждению тканей или органов. Как описано здесь, в определенных вариантах осуществления определение воспаления у индивидуума с установленным заболеванием может включать анализ индивидуума на наличие по меньшей мере одного маркера, указывающего на наличие воспаления.

Воспалительным заболеванием считается заболевание, которое проявляет клинические проявления (аномальные клинические маркеры), такие как видимое воспаление, включая боль, отек, тепло и покраснение, и в отношении настоящего изобретения будет включать в качестве возбудителя антигенспецифичные патологические CD4⁺ Т-клетки. Воспалительные заболевания включают, без ограничения, аутоиммунные заболевания и могут дополнительно включать заболевания со специфическим компонентом, опосредованным Т-клетками. Аутоиммунные заболевания включают, например, рассеянный склероз, MS, SLE, RA, IDDM, NMO и т.д.

Воспалительные демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы представляют особый интерес и включают, без ограничений, рассеянный склероз (РС), оптический нейромиелит (НО) и экспериментальный приобретенный энцефалит (ЕАЕ). Демиелинизирующие заболевания могут быть инициированы пептидами миелоассоциированных белков, например, MOG, MBP, MAG и т.д. Демиелинизирующие заболевания периферической нервной системы включают синдром Гийена-Барре (СГБ) с его подтипами острую воспалительную демиелинизирующую полирадикулоневропатию, острую моторную аксональную нейропатию, острую двигательную и сенсорную аксональную ней-

ропатию, синдром Миллера Фишера и острую пандисаутономию; хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP) с ее подтипами классический CIDP, CIDP с диабетом, CIDP/моноклональная гаммопатия неопределенного значения (MGUS), сенсорная CIDP, мультифокальная моторная нейропатия (MMN), мультифокальная приобретенная демиелинизирующая сенсорная и моторная невропатия или синдром Льюиса-Самнера, мультифокальная приобретенная сенсорная и моторная невропатия и дистальная приобретенная демиелинизирующая сенсорная нейропатия. Хотя бас традиционно не классифицируется как воспалительное заболевание, было обнаружено, что он имеет повышенное количество макрофагов CD49e и может лечиться способами, описанными в настоящем описании.

Рассеянный склероз характеризуется различными симптомами и признаками дисфункции ЦНС, с ремиссиями и повторяющимися обострениями. Классификации, представляющие интерес для анализа способами по изобретению, включают рецидивирующий ремиттирующий MS (RRMS), первичный прогрессирующий MS (PPMS) и вторичный прогрессирующий MS (SPMS). Наиболее распространенными симптомами являются парестезии в одной или нескольких конечностях, в туловище или на одной стороне лица; слабость или неуклюжесть ноги или руки; или нарушения зрения, например, частичная слепота и боль в одном глазу (ретробульбарный неврит зрительного нерва), тусклость зрения или скотомы. Другими распространенными ранними симптомами являются глазной паралич, приводящий к двоению в глазах (диплопия), преходящей слабости одной или нескольких конечностей, незначительной скованности или необычной утомляемости конечности, незначительным нарушениям походки, трудностям с контролем мочевого пузыря, головокружению и легким эмоциональным нарушениям; все они указывают на рассеянное поражение ЦНС и часто возникают за месяцы или годы до того, как болезнь будет распознана. Избыточное тепло может усугубить симптомы и признаки.

Оптический нейромиеелит (NMO), или болезнь Девика, является аутоиммунным, воспалительным заболеванием зрительных нервов и спинного мозга. Хотя воспаление может влиять на мозг, расстройство отличается от рассеянного склероза, имея другую картину ответа на терапию, возможно другую картину аутоантигенов и участие различных подмножеств лимфоцитов.

Основными симптомами болезни Девика являются потеря зрения и функции спинного мозга. Что касается других этиологий неврита зрительного нерва, то нарушение зрения обычно проявляется снижением остроты зрения, хотя дефекты поля зрения или потеря цветового зрения могут возникать изолированно или до формальной потери остроты. Дисфункция спинного мозга может привести к мышечной слабости, снижению чувствительности или потере контроля над мочевым пузырем и кишечником. Повреждение спинного мозга может варьироваться от воспалительной демиелинизации до некротического повреждения белого и серого вещества. Воспалительные поражения при болезни Девика были классифицированы как поражения типа II (комплементарно-опосредованная демиелинизация), но они отличаются от поражений MS pattern II их заметным периваскулярным распределением. Таким образом, картина воспаления часто довольно отличается от той, которая наблюдается при РС.

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хронический синдром, характеризующийся обычно симметричным воспалением периферических суставов, потенциально приводящим к прогрессирующему разрушению суставных и околосуставных структур, с генерализованными проявлениями или без них (Firestein (2003) Nature 423(6937):356-61; Макиннес и Шерт. (2011) N Engl J Med. 365(23):2205-19). Причина неизвестна. Была выявлена генетическая предрасположенность, которая в некоторых популяциях локализована на пентапептид в локусе бета1 HLA-DR генов гистосовместимости класса II. Факторы окружающей среды также могут играть определенную роль.

Известные иммунологические аномалии, которые могут быть важны в патогенезе, включают анти-тела и иммунные комплексы, обнаруженные в клетках суставной жидкости и при васкулите. Плазматические клетки вырабатывают антитела, которые способствуют этим комплексам. Лимфоциты, которые проникают в синовиальную ткань, являются в первую очередь Т-хелперами, которые могут продуцировать провоспалительные цитокины. Макрофаги и их цитокины (например, фактор некроза опухоли, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) также в избытке присутствуют в больном синовиальном отделе. Повышенная адгезия молекул способствует воспалительной эмиграции клеток и удержанию в синовиальной ткани. Повышенные клетки слизистой оболочки, полученные из макрофагов, заметны вместе с некоторыми лимфоцитами и сосудистыми изменениями на ранних стадиях заболевания.

Системная красная волчанка (СКВ) является системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся скуловыми высыпаниями, язвами полости рта, фоточувствительностью, серозитом, судорогами, низким количеством лейкоцитов, низким количеством тромбоцитов, судорогами, положительным тестом на антиядерные антитела (ANA) и другими положительными аутоантителами. СКВ является аутоиммунным заболеванием, часто характеризующимся активацией поликлональных В-клеток, что приводит к различным антибелковым и небелковым аутоантителам, которые приводят к иммунным комплексам и воспалению, которое способствует повреждению тканей, однако патологические CD4⁺ Т-клетки также могут быть вовлечены. СКВ имеет переменное течение, характеризующееся обострениями и ремиссиями и может быть трудноизучимым для изучения. Например, некоторые пациенты могут де-

монстрировать преимущественно кожную сыпь и боль в суставах, проявлять спонтанные ремиссии и требовать мало лекарств. Другой конец спектра включает пациентов, которые демонстрируют тяжелое и прогрессирующее поражение почек (гломерулонефрит и церебрит), что требует терапии высокими дозами стероидов и цитотоксических препаратов, таких как циклофосфамид.

Воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, включают аутоиммунный приступ кишечника. Эти заболевания вызывают хроническую диарею, часто кровавую, а также симптомы дисфункции толстой кишки.

Системный склероз (SSc, или склеродермия) - аутоиммунное заболевание, характеризующееся фиброзом кожи и внутренних органов и широко распространенной васкулопатией. Пациенты с SSc классифицируются в соответствии со степенью кожного склероза: пациенты с ограниченным SSc имеют утолщение кожи лица, шеи и дистальных конечностей, в то время как пациенты с диффузным SSc также имеют участие туловища, живота и проксимальных конечностей. Поражение внутренних органов, как правило, происходит раньше в ходе заболевания у пациентов с диффузным заболеванием по сравнению с ограниченным заболеванием (Laing et al. (1997) *Arthritis*. Насморк. 40:734-42). Большинство пациентов с диффузным SSc, у которых развивается тяжелое поражение внутренних органов, будут делать это в течение первых трех лет после постановки диагноза, в то же время кожа становится прогрессивно фиброзной (Steen and Medsger (2000) *Arthritis Rheum.* 43:2437-44.). Общие проявления диффузного SSc, которые ответственны за существенную заболеваемость и смертность, включают интерстициальное заболевание легких (ILD), феномен Рейно и цифровые изъязвления, легочную артериальную гипертензию (ЛАГ) (Trad et al. (2006) *Arthritis*. Насморк. 54:184-91.), костно-мышечные симптомы, а также поражение сердца и почек (Ostojic and Damjanov (2006) *Clin. Ревматол.* 25:453-7). Современные методы лечения сосредоточены на лечении конкретных симптомов, но модифицирующие болезнь агенты, нацеленные на основной патогенез, отсутствуют.

Аутоиммунный гепатит - это заболевание, при котором иммунная система организма атакует клетки печени. Этот иммунный ответ вызывает воспаление печени, также называемое гепатитом. Генетический фактор может сделать некоторых людей более восприимчивыми к аутоиммунным заболеваниям. Выделяют четыре подтипа аутоиммунного гепатита, но клиническая полезность различия подтипов ограничена. (1) положительные АНА и СМА, повышенный иммуноглобулин G (классическая форма, хорошо реагирует на низкие дозы стероидов); (2) положительный ЛКМ-1 (как правило, дети и подростки женского пола; заболевание может быть тяжелым), ЛКМ-2 или ЛКМ-3; (3) положительные антитела против растворимого антигена печени (эта группа ведет себя как группа 1) (анти-SLA, анти-LP), и (4) не обнаружено аутоантител (~ 20%) (спорной валидности/важности) (Krawitt et al. *Аутоиммунный гепатит. New England Journal of Medicine*, 1996 334 (14): 897-903).

Многие дегенеративные заболевания имеют основной воспалительный компонент, и примеры таких дегенеративных заболеваний включают остеоартрит (ОА), болезнь Альцгеймера (БА) и дегенерацию желтого пятна.

Остеоартрит (ОА) поражает почти 27 млн человек в Соединенных Штатах, что составляет 25% посещений врачей первичной медико-санитарной помощи и половину всех рецептов НПВП. ОА является хронической артропатией, характеризующейся нарушением и потенциальной потерей суставного хряща наряду с другими изменениями суставов, включая ремоделирование кости, которое может включать гипертрофию кости (образование остеофита), субхондральный склероз и образование субхондральных кист. ОА рассматривается как недостаточность синовиального сустава. ОА приводит к деградации суставов, включая суставной хрящ и субхондральную кость, что приводит к механическим аномалиям и нарушению функции суставов. Симптомы могут включать боль в суставах, болезненность, скованность, иногда выпот и нарушение функции сустава. Различные причины могут инициировать процессы, приводящие к потере хряща.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием в популяции. БА поражает примерно 10% людей старше 65 лет и почти 50% людей старше 85 лет. По оценкам, к 2025 г. около 22 млн человек будут страдать от БА. БА характеризуется медленно прогрессирующей деменцией. Окончательный диагноз БА ставится, если триада деменции, нейрофибриллярные клубки и старческие бляшки обнаруживаются посмертно. Старческие бляшки неизменно обнаруживаются в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. Основным компонентом старческих бляшек является бета-амилоидный белок (Аβ). Аβ представляет собой пептид 42 аминокислоты, который получен из белка-предшественника амилоида (APP), который представляет собой трансмембранный гликопротеин с различными физиологическими ролями, включая пролиферацию клеток, адгезию, клеточную сигнализацию и рост нейритов. APP обычно расщепляется в пределах домена Аβ для создания секретруемого фрагмента. Однако альтернативная обработка приводит к расщеплению APP для получения растворимого Аβ, который может накапливаться в старческих бляшках. В настоящее время доступными препаратами являются центральные ингибиторы холинэстеразы, направленные на повышение концентрации постсинаптического ацетилхолина в головном мозге. Эти препараты обеспечивают минимальную клиническую пользу только по нескольким когнитивным параметрам.

Макулярная дегенерация может быть влажного типа, связанного с неоваскуляризацией сетчатки и сосудистой утечкой, но чаще относится к сухому типу, также известному как возрастная макулярная дегенерация (ВМД). ВМД является хроническим заболеванием, связанным с потерей центрального зрения, помутнением зрения и, в конечном счете, слепотой. Хотя причины и факторы риска развития ВМД являются многофакторными, активация врожденного иммунитета, включая активацию комплемента, а также выработку цитокинов макрофагами и микроглиями, была вовлечена в развитие ВМД. Противовоспалительная терапия, включающая кортикостероиды, нестероидные противовоспалительные средства, метотрексат, рапамицин и биологические агенты, включая ингибиторы ФНО и ингибиторы комплемента, была предложена для замедления прогрессирования ВМД (Wang et al., 2011. Глаз (2011)25, 127-139). Однако, поскольку эти методы лечения не являются лечебными, а ВМД является хроническим, несмертельным заболеванием, их использование ограничено риском токсичности.

Инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM) является клеточно-опосредованным аутоиммунным расстройством, приводящим к разрушению инсулин-секретирующих бета-клеток и явной гипергликемии. Т-лимфоциты вторгаются в островки Лангерганса и специфически разрушают инсулин-продуцирующие бета-клетки. Истощение бета-клеток приводит к неспособности регулировать уровень глюкозы в крови. Явный диабет возникает, когда уровень глюкозы в крови поднимается выше определенного уровня, обычно около 250 мг/дл. У человека длительный предсимптоматический период предшествует началу сахарного диабета. В этот период происходит постепенная потеря функции бета-клеток поджелудочной железы. Прогрессирование заболевания может контролироваться у лиц, у которых семейный анамнез и генетический анализ диагностируются как восприимчивые. Наиболее важный генетический эффект наблюдается с генами основного локуса гистосовместимости (IDDM1), хотя другие локусы, включая область гена инсулина (IDDM2), также показывают связь с заболеванием.

Сахарный диабет II типа и метаболический синдром. Сахарный диабет II типа характеризуется резистентностью к инсулину и гипергликемией, что, в свою очередь, может вызвать ретинопатию, нефропатию, невропатию или другие заболевания. Кроме того, диабет является хорошо известным фактором риска развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний. Метаболический синдром относится к группе факторов, включая гипертонию, ожирение, гиперлипидемию и резистентность к инсулину (проявляющуюся в виде откровенного диабета или высокого уровня глюкозы натощак или нарушения толерантности к глюкозе), что повышает риск развития сердечных заболеваний, диабета или других проблем со здоровьем. Существует хорошо охарактеризованный прогресс от нормального метаболического статуса до состояния нарушенной глюкозы натощак (IFG: уровень глюкозы натощак более 100 мг/дл) или до состояния нарушенной толерантности к глюкозе (IGT: двухчасовые уровни глюкозы от 140 до 199 мг/дл после 75-граммового перорального вызова глюкозы). Как IFG, так и IGT считаются преддиабетическими состояниями, причем более 50% субъектов с IFG прогрессируют до откровенного диабета II типа в течение, в среднем, трех лет. Резистентность к инсулину вызвана, по крайней мере частично, хроническим воспалением низкой степени. Макрофаги накапливаются в тучной жировой ткани, где они продуцируют TNF и другие воспалительные цитокины в ответ на стимуляцию насыщенными жирными кислотами и циркулирующим липополисахаридом (LPS). Кроме того, ингибирование ФНО может отменить резистентность к инсулину.

Атеросклероз и атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания являются заболеваниями артериальной стенки. Они характеризуются накоплением жировых материалов в артериальной стенке, в результате чего развиваются жировые бляшки, которые могут разрываться и вызывать окклюзию сосудов и ишемию. Если такая окклюзия сосудов и ишемия происходят в коронарной артерии, может возникнуть инфаркт миокарда. Атеросклеротическое поражение содержит высоковоспалительную среду, характеризующуюся накоплением воспалительных клеток, включая макрофаги и в меньшей степени Т- и В-клетки, и производством высоких уровней воспалительных цитокинов, хемокинов и MMP (Libby et al., Nature 2011. 473(7347):3170-25). Атеросклероз также может быть связан с низкосортным системным воспалением, о чем свидетельствует высокий уровень высокочувствительного СРБ (hsCRP) в крови, аномалия, которой можно частично противостоять путем лечения препаратом розувастатина (Libby et al., Nature 2011. 473(7347):3170-25).

В дополнение к аутоиммунным заболеваниям воспалительные заболевания и заболевания, связанные с воспалением, могут включать, но не ограничиваются ими, вульгарные угри, акне конглобаты, акне фульминанты, астма, целиакия, хронический простатит, язвенный колит, микроскопический колит, коллагенозный колит, болезнь Крона, атопический дерматит, дивертикулит, гломерулонефрит, интерстициальный цистит, вирусный гепатит, включая, но не ограничиваясь гепатитом В и гепатитом С, интерстициальный цистит, синдром раздраженного кишечника, реперфузионное повреждение, саркоидоз, амилоидоз и отторжение трансплантата, включая, но не ограничиваясь, трансплантацией сердца, легких, почек, поджелудочной железы, костного мозга, стволовых клеток, кожи, роговицы и островковых клеток. Дополнительные воспалительные заболевания и заболевания, связанные с воспалением, включают инфекционные заболевания, связанные с воспалением, которые включают, но не ограничиваются ими, хроническую инфекцию вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита С (ВГС), вирусом гепатита В (ВГВ), сифилисом, риккетсиозом, болезнью Лайма, бактериальным целлюлитом, хронической

грибковой инфекцией, эрлихиозом, HHV-6, вирусом простого герпеса 1 и 2, токсоплазмозом, вирусом Эпштейна Барра, цитомегаловирус, микоплазменная инфекция, болезнь Крейтцфельда-Якоба, онкоцеркоз, нокардия, болезнь Уиппла, микобактериальная болезнь, инфекция тиней и альфа-вирусы, включая, но не ограничиваясь чикунгуньей, вирусом реки Росс или другими альфа-вирусами. Дополнительные воспалительные заболевания и заболевания, связанные с воспалением, включают, но не ограничиваются ими, антифошопилидный синдром, тиреоидит Хашимото, тиреоидит Де Кервена, тиреоидит Грейвса, адреналит, сахарный диабет I типа, гипопизит, пузырьчатка обыкновенная, буллезный пемфигоид, синдром Итона Ламберта, миастения, болезнь Аддисона, анкилозирующий спондилоартрит, алопеция мочеочника, аутоиммунная гемолитическая анемия, иммунная тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунный гепатит, Behcet болезнь, кардиомиопатия, синдром хронической усталости, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, рубцовый пемфигоид, болезнь Дегоса, дерматомиозит/ювенильный дерматомиозит, полимиозит, миозит инклюзии тела, синдром Гийена-Барре, болезнь Меньера, смешанная болезнь соединительной ткани, васкулит пернициозной анемии, полихондрит, полигландулярный аутоиммунный синдром, полимиалгия ревматическая, первичный билиарный цирроз печени, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, реактивный артрит, ревматическая лихорадка, склеродермия, синдром Шегрена, синдром жесткого человека, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, узелковый полиартериит, увеит, витилиго, аутоиммунная болезнь Вильсона, нарушения свертываемости крови из-за аутореактивности против факторов свертывания крови, хроническая крапивница, васкулит, включая, но не ограничиваясь гранулематозом с полиангиитом, эозинофильный гранулематоз с полиангиитами, микроскопический микроскопический полиангииты, генох шонлиен пурпура, гиперчувствительность васкулита, гипокомплементемический крапивницкий васкулит, узелковый полиартериит.

Воспалительные состояния также могут возникать в контексте инфекции, включая, помимо прочего, бактериальные, вирусные, простейшие и грибковые инфекции, где перекрестная реактивность с патогенным антигеном и самоантигенами приводит к воспалению и нежелательной активности CD4⁺ Т-клеток против собственных антигенов. Вирусные патогены, представляющие интерес, включают, помимо прочего, коронавирусную инфекцию, например, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV и тому подобное, а также другие вирусы, которые вызывают усиленную воспалительную реакцию и самореактивные ответы Т-клеток. Другие микробы, представляющие интерес, но не ограничивающиеся следующим, включают: *Yersinia* sp., например, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*; Франциселла сп.; Пастурелла сп.; *Vibrio* sp., например, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*; *Legionella* sp., например, *L. pneumophila*; *Listeria* sp., например, *L. monocytogenes*; *Mycoplasma* sp., например, *M. hominis*, *M. pneumoniae*; *Mycobacterium* sp., например, *M. tuberculosis*, *M. leprae*; *Rickettsia* sp., например, *R. rickettsii*, *R. typhi*; *Chlamydia* sp., например, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Helicobacter* sp., например, *H. pylori* и др. Также включены внутриклеточные простейшие патогены, например, *Plasmodium* sp, *Trypanosoma* sp., *Giardia* sp., *Toxoplasma* sp., *Leishmania* sp. и др.

Идентификация и выделение регуляторных Т-клеток

В настоящем описании показано, что антиген-специфические Т-клетки МНС класса I имеют четкое время для расширения после воздействия антигена и имеют четкий фенотип, который можно удобно описать как фенотип клеточной поверхности, который обеспечивает легкость идентификации и выделения.

Как описано в примерах, при контакте (например, иммунизации) с антигеном, инициирующим ан, наблюдается увеличение частоты общих CD4⁺ Т-клеток в крови примерно с 8-12 дня после иммунизации, которая снижается в течение следующих 7-10 дней. Наблюдается сопутствующее увеличение частоты общих CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток в крови, что соответствует снижению и увеличению CD4⁺ Т-клеток. Эта модель синхронного поведения в этих популяциях Т-клеток также наблюдалась в других тканях, например, в ЦНС и т. д. Ткани, которые являются источником Т-клеток, такие как селезенка и лимфатический узел, могут иметь различный паттерн синхронного поведения, с постепенным снижением частоты общих CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток до 7-го дня, затем повышение частоты. Все три типа Т-клеток показали повышенную клональную экспансию, начиная примерно с 7-го дня после иммунизации. Клонально расширенные клетки CD4⁺ активируются, например, являются CD44^{high}CD6L^{low} и специфичны для инициирующего антигена. Клонально расширенные клетки CD8⁺ не реагируют на инициирующий антиген.

Изолированные популяции регуляторных (CD8⁺KIR⁺) Т-клеток могут быть использованы в качестве терапевтических агентов, могут быть генетически модифицированы для экспрессии экзогенного TCR, могут быть проверены для определения антигенной специфичности TCR и тому подобное. Клетки могут быть выделены из содержащего клетки биологического образца от человека, представляющего интерес, в любое время, но удобно могут быть получены в момент наибольшего расширения в крови. После иммунной стимуляции, включая, например, иммунизацию, пик регуляторных клеток в крови может быть примерно на 7-й день, около 8-го дня, около 9-го дня, около 10-го дня, около 11-го дня, примерно на 12-й день, примерно на 13-й день после иммунизации. Количество регуляторных Т-клеток в крови обычно низкое, например менее примерно 2%, менее примерно 1,5%, менее примерно 1%, менее примерно 0,5% от общего PBMC.

Маркеры регуляторных Т-клеток включают CD8 и, как правило, один или несколько белков KIR, включая, без ограничений, один или более из KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2; и может конкретно включать один или несколько KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR3DL1. Клетки могут дополнительно характеризоваться экспрессией маркеров, включая, без ограничений, CD38, HLA-DR, CD29, CD44, CD122 и т.д. Клетки могут быть охарактеризованы как активированные, например, CD44^{high}CD6L^{low}. Клетки также могут быть охарактеризованы для экспрессии TCR, связанного с регуляторными Т-клетками, например, путем связывания полипептида мультимерного пептида/МНС.

Маркеры могут быть обнаружены и/или использованы для отбора или выделения клеток путем связывания с аффинным реагентом, например, специфическим связующим элементом, который посредством химических или физических средств специфически связывается с маркером на клетке (т.е. вторым специфическим связующим элементом). Конкретные пары связывания, представляющие интерес, включают углеводы и лектины; комплементарные нуклеотидные последовательности; пептидные лиганды и рецепторы; эффекторные и рецепторные молекулы; гормоны и белок, связывающий гормоны; кофакторы ферментов и ферменты; ингибиторы ферментов и ферменты и т.д. Специфические пары связывания могут включать аналоги, производные и фрагменты исходного специфического связующего элемента. Например, пара рецептора и лиганда может включать пептидные фрагменты, химически синтезированные пептидомиметики, меченый белок, дериватизированный белок и т.д.

Особенно полезными реагентами являются антитела, специфичные для маркеров, присутствующих на нужных клетках (для положительного отбора) и нежелательных клеток (для отрицательного отбора). Могут быть использованы целые антитела или фрагменты, например, Fab, F(ab)₂, легкие или тяжелые фрагменты цепи и т.д. Такие селекционные антитела могут быть поликлональными или моноклональными и, как правило, коммерчески доступны или, альтернативно, легко продуцируются способами, известными специалистам в данной области техники. Антитела, отобранные для использования, будут иметь низкий уровень неспецифического окрашивания и обычно будут иметь сродство по меньшей мере около 100 μ M к антигену.

В одном варианте осуществления изобретения антитела для отбора соединяют с пластиной, шариком, магнитным реагентом и т.п.; или помечают меткой, такой как флуоресцентная метка, массовая метка и т.д., которая позволяет проводить отбор. Точный способ соединения не имеет решающего значения для практической реализации изобретения, и в данной области известен ряд альтернатив. Прямое соединение прикрепляет антитела к пластине, частицам, магнитному реагенту и т.д. Косвенное соединение может быть достигнуто несколькими способами. Антитела могут быть соединены с одним элементом высокоаффинной системы связывания, например, биотином, и частицами, присоединенными к другому элементу, например, авидину. Можно также использовать антитела второй стадии, которые распознают видоспецифичные эпитопы антител, например, анти-мышинный Ig, антикрысиный Ig и т.д.

Функционально значимые регуляторные Т-клетки могут быть очищены из образцов тканей или из культур. Очищенные клеточные популяции полезны для анализа экспрессии генов, скрининговых анализов лекарств, в терапевтических целях, для культур искусственной кокультур и тому подобного.

Полученные таким образом клеточные композиции являются высокоочищенными, где желаемые клетки могут составлять по меньшей мере приблизительно 50% желаемого типа клеток, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или более.

Для положительного или отрицательного отбора разделение популяции подлежащих клеток использует аффинное разделение, чтобы обеспечить по существу чистую популяцию. Методы аффинного разделения могут включать магнитную сепарацию с использованием магнитных шариков, покрытых антителами, аффинную хроматографию, цитотоксические агенты, соединенные с моноклональным антителом или используемые в сочетании с моноклональным антителом, например, комплементом и цитотоксинами, и "панорамирование" антителом, прикрепленным к твердой матрице, например, пластине или другому удобному методу. Может быть использован любой метод, который не наносит чрезмерного ущерба жизнеспособности клеток.

Положительная иммуноселекция использует реагент, который избирательно связывается, например, с CD8, ингибирующими белками KIR и т.д. На поверхности клеток. Отрицательная иммуноселекция необязательно выполняется для истощения клеток других линий, например CD4, маркеров В-клеток, моноцитарных маркеров и т.д. Размер, например, прямое рассеяние, может быть использован для защиты клеток крови, отличных от лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления используют два, три, четыре, пять или более реагентов отрицательного иммуновыбора, например, в коктейле или в отдельных отрицательных выделениях. В некоторых вариантах осуществления линейный коктейль, содержащий реагенты для отрицательного отбора каждой из миелоидных клеток; В-клетки, CD4⁺ Т-клетки и т.д. Там, где используется отрицательное разделение, оно часто выполняется до положительного отбора, чтобы истощить клеточную популяцию нежелательных клеток. Затем выполняется положительный отбор.

Специфические связывающие элементы, обычно антитела, добавляются к суспензии клеток и инкубируются в течение периода времени, достаточного для связывания имеющихся антигенов. Инкубация

обычно составляет не менее 2 минут и может быть менее 30 мин. Желательно иметь достаточную концентрацию антител в реакционной смеси, чтобы эффективность разделения не ограничивалась отсутствием реагента. Соответствующая концентрация определяется титрованием.

Средой, в которой разделяются клетки, будет любая среда, которая поддерживает жизнеспособность клеток. Различные среды имеются в продаже и могут использоваться в зависимости от природы клеток, включая модифицированную среду Eagle компании Dulbecco (DMEM), основной солевой раствор Хэнка (HBSS), физиологический раствор с фосфатным буфером компании Dulbecco (DPBS), RPMI, среду Iscove, PBS с 5 мм ЭДТА и т.д. Клетки могут быть помещены в культуру, приготовлены для терапии, заморожены и т.д.

Полученные таким образом композиции имеют множество применений в клинической терапии, исследованиях, разработках и коммерческих целях. В терапевтических целях, например, терапевтически эффективная доза может быть введена для селективного подавления нежелательных патогенных реакций Т-клеток, необязательно после расширения культуры.

Экспансия или активация в культуре может использовать цитокины и/или антигенпредставляющие клетки (APC). Контакт может быть осуществлен в любой подходящей питательной среде. Там, где он присутствует, APC может быть загружен подходящим пептидным антигеном или белком, который затем представлен на поверхности клетки. Соотношение Т-клеток к APC, если оно присутствует, может составлять от примерно 1:20 до примерно 20:1 и не является критическим до тех пор, пока количество APC не ограничено. Может быть достаточным период от 8 дней, до 10 дней, до 12 дней, до 14 дней (см., например, Dudley et al., JCO 2005; 23(10):2346-2357). Загрунтованные таким образом регуляторные Т-клетки могут быть использованы для любой желаемой цели, включая экспериментальные цели, связанные с определением специфичности к антигену, профилированием цитокинов и т.п., и для доставки в естественных условиях.

Цитокины, которые полезны для расширения искусственно, включают, без ограничений, один или несколько цитокинов, которые усиливают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, которые могут включать, без ограничений, IFN типа I (IFN α и IFN β), IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-25, IL-27, IL-33 и т.д. Клетки могут культивироваться в обычных питательных средах. Коммерчески доступные носители, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI 1640 (Sigma) и Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma), подходят для культивирования клеток. Любая из этих сред может быть дополнена по мере необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеозидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками, микроэлементами и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые были бы известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются теми, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны обычно квалифицированному ремесленнику.

Активация *ex vivo* Т-клеток может быть достигнута с помощью процедур, установленных в данной области техники, включая активацию Т-клеток на клеточной основе, активацию на основе антител или активацию с использованием различных реагентов активации на основе шариков. Активация Т-клеток на клеточной основе может быть достигнута путем воздействия Т-клеток на антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки или искусственные антигенпрезентирующие клетки, такие как облученные клетки K562. Активация на основе антител молекул CD3 на поверхности Т-клеток с растворимыми моноклональными антителами против CD3 также поддерживает активацию Т-клеток в присутствии IL-2.

Т-клетки могут быть культурами, контактирующими с поверхностью, обеспечивающей агент, который стимулирует сигнал, связанный с комплексом CD3 TCR (например, антитело против CD3) и агентом, который стимулирует костимуляторную молекулу на поверхности Т-клеток (например, антитело против CD28). Активация Т-клеток на основе шариков может быть достигнута с использованием коммерчески доступных реагентов активации Т-клеток, включая, но не ограничиваясь, invitrogen® CTS Dynabeads® CD3/28 (Life Technologies, Inc. Carlsbad CA) или Miltenyi MACS® GMP ExpAct Treg бусины Miltenyi MACS GMP TransAct CD3/28 (Miltenyi Biotec, Inc.). Условия, подходящие для культуры Т-клеток, хорошо известны в данной области техники. Lin, et al. (2009) *Cytotherapy* 11(7):912-922; Смит™ и др. (2015) *Клиническая и трансляционная иммунология* 4:e31 опубликована онлайн 16 января 2015 года. Клетки-мишени поддерживаются в условиях, необходимых для поддержки роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% сек).

Регуляторные Т-клетки, выделенные таким образом и необязательно расширенные, необязательно генетически модифицированы, например, для экспрессии TCR, отличного от нативного TCR. Регуляторные Т-клетки, расширенные во время иммунного ответа на вакцину, например, могут быть модифицированы для экспрессии TCR, специфичного для подавления аутоиммунного заболевания, трансплантационного антигена и т.д. Трансдукция Т-клеток с вектором экспрессии может быть выполнена с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь, коинкуба-

цию с Т-клетками хозяина с вирусными векторами, электропорация и/или химически усиленная доставка.

Альтернативно инженерный TCR может быть вставлен, например, CRISPR/Cas9; мегануклеазой; спроектированная I-CreI самонаводящаяся эндонуклеаза и др. См., например, Eyuquem et al. (2017) Nature 543: 113-117, and Georgiadis et al. (2018) Mol. Ther. 26:1215-1227.

Чтобы определить пригодность клеточных композиций для терапевтического введения, клетки могут быть сначала протестированы на подходящей животной модели. На одном уровне клетки оцениваются на предмет их способности выживать и поддерживать свой фенотип в естественных условиях. Клеточные композиции вводят иммунодефицитным животным (таким как обнаженные мыши или животные, ставшие иммунодефицитными химически или путем облучения). Ткани собирают после периода отрастания и оценивают на предмет того, присутствуют ли введенные клетки или их потомство.

В терапевтических целях клетки могут быть аутологичными или аллогенными. В таких случаях ограничение МНС регуляторной Т-клетки будет соответствовать типу МНС реципиента.

Эффективная доза регуляторных клеток вводится реципиенту и позволяет контактировать с CD4+ Т-клетками в их родной среде, например в лимфатических узлах и т.д. Дозировка и частота могут варьироваться в зависимости от средства; способа введения; и тому подобное. Специалист в данной области техники поймет, что такие руководящие принципы будут скорректированы с учетом индивидуальных обстоятельств. Дозировка также может варьироваться для локализованного введения, например, интраназального, ингаляционного и т.д., или для системного введения, например, т.м., т.п., т.в. и т.п. Усиленный иммунный ответ может проявляться в виде увеличения цитолитического ответа регуляторных Т-клеток на клетки-мишени, присутствующие у реципиента, например, уменьшение симптомов аутоиммунного заболевания; и тому подобное.

Регуляторные Т-клетки могут быть предоставлены в фармацевтических композициях, пригодных для терапевтического использования, например, для лечения человека. Терапевтические составы, содержащие такие клетки, могут быть заморожены или приготовлены для введения с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде водных растворов. Клетки будут сформулированы, дозированы и введены в соответствии с хорошей медицинской практикой. Факторы для рассмотрения в этом контексте включают конкретное расстройство, которое лечится, конкретное млекопитающее, которое лечится, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, планирование введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

Клетки можно вводить любым подходящим способом, обычно парентеральным. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное (болусное или медленное инфузионное), внутриартериальное, внутрибрюшинное, интратекальное или подкожное введение.

Регуляторные Т-клетки могут быть введены субъекту в любой физиологически приемлемой среде, обычно внутрисосудисто, хотя они также могут быть введены в любой другой удобный участок, где клетки могут найти подходящее место для роста. Обычно вводят по меньшей мере приблизительно 104 клетки/кг, по меньшей мере приблизительно 105 клеток/кг; по меньшей мере приблизительно 106 клеток/кг, по меньшей мере приблизительно 107 клеток/кг или более, обычно ограниченные количеством Т-клеток, которые получаются во время сбора.

Курс терапии может быть однократной дозой или в многократных дозах в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в однократной дозе. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в двух или более разделенных дозах, вводимых в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 30, 60, 90, 120 или 180 дней. Количество клеток, вводимых в таких протоколах сплит-дозирования, может быть одинаковым при каждом введении или может быть предоставлено на разных уровнях. Многодневные протоколы дозирования в течение определенных периодов времени могут быть предоставлены квалифицированным специалистом (например, врачом), контролирующим введение клеток с учетом реакции субъекта на лечение, включая побочные эффекты лечения и их модуляцию, как обсуждалось выше.

Скрининг на антигенную специфичность

Выбранные регуляторные Т-клетки могут быть использованы в качестве источника последовательностей, кодирующих TCR, обеспечивающих антиген-специфическое подавление нежелательных CD4+ Т-клеточных опосредованных ответов. Последовательности кодирования TCR могут быть изолированы любым удобным методом, например, как описано в примерах.

Представляющий интерес TCR может быть выражен в растворимой форме и мультимеризован для использования в качестве селективного связывающего агента. Растворимый белок может представлять собой одну цепь или, как правило, гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления растворимый TCR модифицируют добавлением пептидной последовательности акцептора биотина на С-конце одного полипептида. После биотинилирования в акцепторном пептиде TCR может быть мультимеризован путем связывания с партнером по связыванию биотина, например, авидином, стрептавидином, траптавидином, нейтравидином и т.д. Партнер по связыванию биотина может содержать обнаруживаемую метку, например флуорофор, массовую метку и т.д., или может быть связан с частицей, например парамагнитной час-

тицей. Отбор лигандов, связанных с TCR, может быть выполнен с помощью проточной цитометрии, магнитного отбора и т.п., как известно в данной области техники.

Мультимер TCR используется в анализе связывания с библиотекой разнообразных пептидных антигенов. Пептидный лиганд составляет от примерно 8 до примерно 20 аминокислот в длину, обычно от примерно 8 до примерно 18 аминокислот, от примерно 8 до примерно 16 аминокислот, от примерно 8 до примерно 14 аминокислот, от примерно 8 до примерно 12 аминокислот, от примерно 10 до примерно 14 аминокислот, от примерно 10 до примерно 12 аминокислот. Следует понимать, что полностью случайная библиотека будет представлять собой необычайное число возможных комбинаций. В некоторых способах разнообразие ограничено остатками, которые прикрепляют пептид к доменам связывания МНС, которые в настоящем описании называются анкерными остатками МНС. Положение анкерных остатков в пептиде определяются специфическими доменами связывания МНС. Разнообразие также может быть ограничено на других позициях, о чем свидетельствуют обязательные исследования, например, на якорях TCR. В библиотеке присутствует не менее 106, не менее 107, чаще всего не менее 108 различных пептидных лигандов.

Белки МНС, используемые в библиотеках, могут быть от любых видов млекопитающих или птиц; Особый интерес представляют человеческие HLA-белки. В белки HLA входят субъединицы класса II HLA-DP α , HLA-DP β , HLA-DQ α , HLA-DQ β , HLA-DR α и HLA-DR β , а также белки класса I HLA-A, HLA-B, HLA-C и β 2-микроглобулин.

МНС-связывающие домены обычно представляют собой растворимую форму обычно связанного с мембраной белка. Растворимая форма выводится из нативной формы путем удаления трансмембранного домена. Удобно, что белок усекается, удаляя как цитоплазматический, так и трансмембранный домены. В некоторых таких вариантах осуществления связывающие домены подвергали мутагенезу и выбирали для аминокислотных изменений, которые повышают растворимость одноцепочечного полипептида, без изменения пептидных связывающих контактов. Для белков класса I связывающие домены могут включать α 1, α 2 и α 3 домен аллеля класса I, включая, без ограничений, HLA-A, HLA-B, HLA-C, H-2K, H-2D, H-2L, которые сочетаются с β 2-микроглобулином. Не более чем приблизительно 10, обычно не более примерно 5, предпочтительно ни одна из аминокислот трансмембранного домена не будет включена. Удаление будет таким, что оно не повлияет на способность доменов связывать пептидные лиганды.

Библиотека разнообразных последовательностей генерируется и вставляется в вектор, подходящий для интересующей клетки-хозяина, где вектор может быть, без ограничений, пригодным для экспрессии в дрожжевых клетках, и где дрожжевые клетки могут быть индуцированы для экспрессии полипептидной библиотеки. После введения в клетки-хозяева экспрессия библиотеки индуцируется, и клетки поддерживаются в течение периода времени, достаточного для обеспечения отображения полипептидов библиотеки на клеточной поверхности.

Отбор пептида, который связывается с регуляторным TCR, осуществляется путем объединения мультимеризованного TCR с популяцией клеток-хозяев, экспрессирующих библиотеку. Раунды отбора выполняются до тех пор, пока выбранная популяция не получит сигнал выше фона, обычно выполняется не менее трех и более обычно не менее четырех раундов отбора.

После заключительного раунда отбора полинуклеотиды выделяют из выбранных клеток-хозяев и определяют последовательность выбранных пептидных лигандов, как правило, путем высокопроизводительного секвенирования.

Платформы секвенирования, которые могут быть использованы в настоящем описании изобретения, включают, но не ограничиваются ими: пиросеквенирование, секвенирование синтезом, секвенирование одной молекулы, секвенирование второго поколения, секвенирование нанопор, секвенирование путем лигирования или секвенирование путем гибридизации. Предпочтительными платформами секвенирования являются те, которые коммерчески доступны от Illumina (RNA-Seq) и Helicos (Digital Gene Expression или "DGE"). Методы секвенирования "следующего поколения" включают, но не ограничиваются ими, те, которые коммерциализируются: 1) 454/Roche Lifesciences, включая, но не ограничиваясь, методами и аппаратами, описанными в Margulies et al., Nature (2005) 437:376-380 (2005); и патент США No 7244559; 7335762; 7211390; 7244567; 7264929; 7323305; 2) Helicos BioSciences Corporation (Кембридж, Массачусетс), как описано в заявке США Ser. № 11/167046 и патенте США No 7501245; 7491498; 7276720; и в публикациях патентных заявок США. US 20090061439; US 20080087826; US 20060286566; US 20060024711; US 20060024678; US 20080213770 и US 20080103058; 3) Прикладные биосистемы (например, секвенирование SOLiD); 4) Dover Systems (например, секвенирование Polonator G.007); 5) Illumina, как описано Патент США № 5750341; 6306597 и 5969119; и 6) Тихоокеанские биологические науки, описанные в патенте США № 7462452; 7476504; 7405281; 7170050; 7462468; 7476503; 7315019; 7302146; 7313308; и номера публикаций в США US 20090029385; US 20090068655; US 20090024331 и US 20080206764. Все ссылки включены в настоящий документ посредством ссылки. Такие методы и устройства приведены здесь в качестве примера и не предназначены для ограничения.

Как показано в примерах, идентифицированный таким образом пептидный антиген может быть нативным пептидом индивидуума или может быть суррогатным пептидом, который специфически активи-

рует регуляторные Т-клетки, представляющие интерес. Пептид, называемый регуляторным пептидом, полезен в качестве инструмента скрининга и находит особое применение в качестве терапевтического агента для активации регуляторных Т-клеток. Регуляторные пептиды могут быть использованы для активации Т-клеток искусственно или в естественных условиях.

Воспалительные заболевания, включая аутоиммунные заболевания, как обсуждается в настоящем описании, можно лечить путем введения субъекту терапевтически эффективного количества регуляторного пептида или активного фрагмента или его производного. Пептиды можно вводить как единое средство, как коктейль из обоих пептидов; или в комбинации со вторым терапевтическим средством.

Регуляторные пептиды обычно содержат по меньшей мере приблизительно 6 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 7 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 8 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 9 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 10 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 11 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 12 аминокислот или более, и могут дополнительно включать слияние полипептидов, известных в данной области техники, в дополнение к предоставленным последовательностям. Регуляторные пептиды, полезные в настоящем изобретении, также включают производные, варианты и биологически активные фрагменты встречающихся в природе регуляторных пептидов и тому подобное. Регуляторная пептидная последовательность может представлять собой разработанную секвенированную, полученную из мутагенеза в разнообразной библиотеке пептидов. Специфичность TCR может быть конформационной, и, таким образом, пептид, который активирует регуляторную Т-клетку, представляющую интерес, может иметь последовательность, по существу не связанную с нативным пептидом.

Регуляторные пептиды могут быть модифицированы, например, соединены с широким спектром других олигопептидов или белков для различных целей. Например, посттрансляционно модифицированные, например, путем пренилирования, ацетилирования, амидирования, карбоксилирования, гликозилирования, пегилирования и т.д. Такие модификации могут также включать модификации гликозилирования, например, те, которые производятся путем модификации паттернов гликозилирования полипептида во время его синтеза и обработки или на дальнейших стадиях обработки; например, путем воздействия на полипептид ферментов, которые влияют на гликозилирование, таких как гликозилирование млекопитающих или дегликозилирующие ферменты. В некоторых вариантах осуществления варианты настоящего изобретения включают варианты, имеющие фосфорилированные аминокислотные остатки, например фосфотирозин, фосфосерин или фосфотреонин.

Способность регуляторного пептида модулировать активность лимфоцитов может быть определена, например, способностью пептида индуцировать цитотоксическое действие на активированные патологические лимфоциты; и тому подобное, как раскрыто в примерах, представленных в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления регуляторный пептид предоставляется в виде слитого белка, например, сплавленного в каркасе со вторым полипептидом. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид способен увеличивать размер белка слияния, например, так, что слитый белок не будет быстро очищаться из циркуляции. В некоторых других вариантах осуществления второй полипептид является частью или целым Fc-областью. В некоторых других вариантах осуществления второй полипептид представляет собой любой подходящий полипептид, который по существу сходен с Fc, например, обеспечивая увеличенный размер и/или дополнительное связывание или взаимодействие с молекулами Ig. Эти слитые белки могут облегчить очистку и показать увеличенный период полувыведения в естественных условиях. Слитые белки, имеющие димерные структуры, связанные с дисульфидом (из-за IgG), также могут быть более эффективными в связывании и нейтрализации других молекул, чем мономерный секретируемый белок или фрагмент белка в одиночку.

В некоторых других вариантах осуществления регуляторные пептидные варианты настоящего изобретения включают варианты, дополнительно модифицированные для повышения их устойчивости к протеолитической деградации или для оптимизации свойств растворимости или для того, чтобы сделать их более подходящими в качестве терапевтического агента. Например, варианты настоящего изобретения дополнительно включают аналоги, содержащие остатки, отличные от встречающихся в природе L-аминокислот, например, D-аминокислот или не встречающихся в природе синтетических аминокислот. D-аминокислоты могут быть заменены некоторыми или всеми аминокислотными остатками.

Полипептиды могут быть получены бесклеточными трансляционными системами или синтетическим синтезом искусственным использованием обычных способов, известных в данной области техники. Доступны различные коммерческие синтетические аппараты, например, автоматизированные синтезаторы Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif., Beckman и др. Используя синтезаторы, встречающиеся в природе аминокислоты могут быть заменены неестественными аминокислотами. Конкретная последовательность и способ приготовления будут определяться удобством, экономичностью, требуемой чистотой и тому подобным.

Полипептиды также могут быть выделены и очищены в соответствии с обычными способами рекомбинантного синтеза. Лизат может быть получен из экспрессии хозяина и лизата, очищенного с использованием ВЭЖХ, эксклюзионной хроматографии, гелевого электрофореза, аффинной хроматографии или другого метода очистки. По большей части композиции, которые используются, будут содер-

жать по меньшей мере 20% по массе желаемого продукта, более обычно по меньшей мере приблизительно 75% по массе, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% по массе, и для терапевтических целей обычно по меньшей мере приблизительно 99,5% по массе, по отношению к загрязняющим веществам, относящимся к способу приготовления продукта и его очистки. Обычно проценты будут основаны на общем белке.

Регуляторный пептид может быть предоставлен в фармацевтических композициях, пригодных для терапевтического использования, например, для лечения человека. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают один или более терапевтических объектов настоящего изобретения или их фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или сольваты. В некоторых других вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают один или более терапевтических объектов настоящего изобретения в сочетании с другим терапевтическим агентом.

Терапевтические вещества часто вводят в виде фармацевтических композиций, содержащих активное терапевтическое средство и другой фармацевтически приемлемый эксципиент. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции могут также включать, в зависимости от желаемой композиции, фармацевтически приемлемые, нетоксичные носители или разбавители, которые определяются как носители, обычно используемые для формулирования фармацевтических композиций для введения животным или человеком. Разбавитель подобран таким образом, чтобы не влиять на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический фосфатно-буферный физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция или композиция могут также включать другие носители или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и тому подобное.

В некоторых других вариантах осуществления фармацевтические композиции могут также включать крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (такие как латексные функционализированные Sepharose.TM., агароза, целлюлоза и т.п.), полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и липидные агрегаты (такие как капли масла или липосомы).

Также предусмотрены методы комбинированной терапии, где комбинация может обеспечить аддитивные или синергетические преимущества. Комбинации регуляторного пептида могут быть получены со вторым агентом, выбранным из одного или более общих классов лекарственных средств, обычно используемых в неантиген-специфическом лечении аутоиммунного заболевания, которые включают кортикостероиды и модифицирующие заболевание лекарственные средства; или из антиген-специфического агента. Кортикостероиды, например, преднизон, метилпреднизон, преднизолон, солумедрол и др., обладают как противовоспалительной, так и иммунорегуляторной активностью. Они могут вводиться системно или могут вводиться локально. Кортикостероиды полезны при ранних заболеваниях в качестве временной дополнительной терапии в ожидании агентов, модифицирующих болезнь, чтобы оказать свое действие. Кортикостероиды также полезны в качестве хронической вспомогательной терапии у пациентов с тяжелым заболеванием.

Безвредные препараты также полезны в комбинированной терапии. К таким средствам относятся метотрексат, лефлуномид этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, анакинра, ритуксимаб, CTLA4-Ig (абатацепт), противомаларийные препараты, соли золота, сульфасалазин, d-пеницилламин, циклоспорин А, циклофосфамид азатиоприн; и тому подобное. Лечение РС может включать интерферон β , копаксон и анти-VLA4, которые снижают частоту рецидивов. РС также лечат иммуносупрессивными агентами, включая метилпреднизолон, другие стероиды, метотрексат, кладрибин и циклофосфамид.

Комбинированная терапия может быть последовательно поэтапной, предоставляемой в составе совместного введения, или одновременным введением в течение того же периода времени. "Одновременное введение" известного терапевтического лекарственного средства с фармацевтической композицией по настоящему изобретению означает введение лекарственного средства и регуляторного пептида в такое время, когда как известное лекарственное средство, так и композиция по настоящему изобретению будут оказывать терапевтическое воздействие. Такое одновременное введение может включать одновременное (т.е. в одно и то же время) предшествующее или последующее введение лекарственного средства в отношении введения соединения по изобретению. Лицо, обладающее обычными навыками в данной области техники, не испытывало бы трудностей с определением соответствующих сроков, последовательности и дозировок введения для конкретных лекарственных средств и композиций по настоящему изобретению.

Регуляторные пептиды могут служить активным ингредиентом в фармацевтических композициях, разработанных для лечения различных расстройств, как описано выше. Активный ингредиент присутствует в терапевтически эффективном количестве, т.е. количестве, достаточном при введении для лечения заболевания или состояния здоровья, опосредованного им, в частности, путем снижения активности воспалительных лимфоцитов. Композиции могут также включать различные другие агенты для улучшения доставки и эффективности, например, для улучшения доставки и стабильности активных ингредиентов.

Таким образом, например, композиции могут также включать, в зависимости от желаемой композиции, фармацевтически приемлемые, нетоксичные носители или разбавители, которые определяются как носители, обычно используемые для формулирования фармацевтических композиций для введения животным или человеком. Разбавитель подобран таким образом, чтобы не влиять на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, буферная вода, физиологический раствор, PBS, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция или композиция могут включать другие носители или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы, эксципиенты и тому подобное. Композиции могут также включать дополнительные вещества для приближения физиологических условий, такие как регулирующие рН и буферные агенты, агенты, регулирующие токсичность, смачивающие агенты и моющие средства. Композиция может также включать любой из множества стабилизирующих агентов, таких как антиоксидант.

Пептид может быть комплексован с различными известными соединениями, которые повышают стабильность полипептида в естественных условиях или иным образом усиливают его фармакологические свойства (например, увеличивают период полувыведения полипептида, снижают его токсичность, повышают растворимость или поглощение). Примеры таких модификаций или комплексообразующих агентов включают сульфат, глюконат, цитрат и фосфат. Полипептиды композиции также могут быть комплексованы с молекулами, которые усиливают их свойства в естественных условиях. К таким молекулам относятся, например, углеводы, полиамины, аминокислоты, другие пептиды, ионы (например, натрий, калий, кальций, магний, марганец) и липиды.

Дальнейшие рекомендации относительно составов, которые подходят для различных типов введения, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985). Краткий обзор методов доставки лекарств см., Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Фармацевтические композиции можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. Токсичность и терапевтическую эффективность активного ингредиента могут быть определены в соответствии со стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах и/или экспериментальных животных, включая, например, определение LD₅₀ (доза, летальная для 50% населения) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% населения). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено как соотношение LD₅₀/D₅₀. Предпочтительны соединения, которые проявляют большие терапевтические показатели.

Данные, полученные из исследований клеточной культуры и/или животных, могут быть использованы при формулировании диапазона дозировок для людей. Дозировка активного ингредиента обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или вообще без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить различными способами. Примеры включают введение композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель пероральным, интраназальным, ректальным, местным, внутрибрюшинным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, подкожным, трансдермальным способом.

Составы, пригодные для парентерального введения, такие как, например, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным, внутрибрюшинным и подкожным путями, включают водные и неводные, изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают препарат изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

Компоненты, используемые для формулирования фармацевтических композиций, предпочтительно имеют высокую чистоту и по существу свободны от потенциально вредных загрязняющих веществ (например, по меньшей мере, национального пищевого (NF) сорта, как правило, по меньшей мере, аналитического класса и, как правило, по меньшей мере, фармацевтического класса). Кроме того, композиции, предназначенные для использования в естественных условиях, предпочтительно стерильны. В той мере, в какой данное соединение должно быть синтезировано перед применением, полученный продукт предпочтительно по существу свободен от любых потенциально токсичных агентов, таких как любые эндотоксины, которые могут присутствовать в процессе синтеза или очистки. Композиции для родительского введения также предпочтительно стерильны, по существу изотоничны и изготовлены в условиях GMP.

Регуляторные пептидные композиции могут вводиться в одной дозе или в многократных дозах, обычно в многократных дозах в течение определенного периода времени, например, ежедневно, через день, еженедельно, по полнеделе, ежемесячно и т.д. в течение периода времени, достаточного для уменьшения тяжести воспалительного заболевания, который может составлять 1, 2, 3, 4, 6, 10 или более доз.

Определение терапевтически или профилактически эффективного количества может быть сделано на основе данных животных с использованием обычных вычислительных методов. В одном варианте осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество содержит от примерно 0,1

мг до примерно 1 г белка. В другом варианте осуществления эффективное количество содержит от примерно 1 до примерно 100 мг белка. В дополнительном варианте осуществления эффективное количество содержит от примерно 10 до примерно 50 мг белка. Эффективная доза будет зависеть, по крайней мере, частично от пути введения. Доза может составлять от примерно 0,1 мкг/кг массы пациента; примерно 1 мкг/кг; примерно 10 мкг/кг; примерно до 100 мкг/кг.

В способах применения эффективную дозу агента по изобретению вводят отдельно или комбинируют с дополнительными активными агентами для лечения состояния, перечисленного выше. Эффективная доза может составлять примерно 1 нг/кг веса, 10 нг/кг веса, 100 нг/кг веса, 1 мкг/кг веса, 10 мкг/кг веса, 25 мкг/кг веса, 50 мкг/кг веса, 100 мкг/кг веса, 250 мкг/кг веса, 500 мкг/кг веса, 750 мкг/кг веса, вес 1 мг/кг, вес 5 мг/кг, вес 10 мг/кг, вес 25 мг/кг, вес 50 мг/кг, вес 75 мг/кг, вес 100 мг/кг, вес 250 мг/кг, вес 500 мг/кг, вес 750 мг/кг и т.п. Дозировку можно вводить несколько раз по мере необходимости, например, каждые 4 ч, каждые 6 ч, каждые 8 ч, каждые 12 ч, каждые 18 ч ежедневно, каждые 2 дня, каждые 3 дня еженедельно и тому подобное. Дозировку можно вводить перорально.

Композиции можно вводить в одной дозе или в многократных дозах, обычно в многократных дозах в течение определенного периода времени, например, ежедневно, через день, еженедельно, по полнеделе, ежемесячно и т.д. в течение периода времени, достаточного для уменьшения тяжести воспалительного заболевания, который может составлять 1, 2, 3, 4, 6, 10 или более доз.

Определение терапевтически или профилактически эффективного количества агента в соответствии с настоящими способами может быть выполнено на основе данных животных с использованием рутинных вычислительных методов. Эффективная доза будет зависеть, по крайней мере, частично от пути введения.

Изобретение было описано в терминах конкретных вариантов осуществления, найденных или предложенных настоящим изобретателем для включения предпочтительных способов для практики изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в свете настоящего раскрытия могут быть внесены многочисленные модификации и изменения в конкретные варианты осуществления, иллюстрируемые ими, не отходя от предполагаемого объема изобретения. Из-за соображений биологической функциональной эквивалентности изменения могут быть внесены в структуру белка, не влияя на биологическое действие в виде или количестве. Предполагается, что все такие изменения будут включены в сферу применения прилагаемых претензий.

Пример 1. Противоположные Т-клеточные реакции при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите

В экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ), модели рассеянного склероза (РС), индукция генерирует последовательные волны клонально расширенных CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток в крови и центральной нервной системе. У пациентов с РС мы также наблюдаем значительные расширения CD8⁺ Т-клеток. В ЕАЕ мы обнаружили, что большинство расширенных CD4⁺ Т-клеток специфичны для индуцирующего пептида миелина MOG35-55, но, напротив, пептидные лиганды, полученные из библиотеки отображения дрожжевого пептида-МНС для некоторых из клонально расширенных CD8⁺ Т-клеток, ингибируют заболевание, подавляя пролиферацию MOG-специфических CD4⁺ Т-клеток. Эти результаты демонстрируют, что индукция аутореактивных CD4⁺ Т-клеток вызывает противоположную мобилизацию регуляторных CD8⁺ Т-клеток.

Здесь мы спросили, происходит ли скоординированный ответ Т-клеток в ЕАЕ, и обнаружили, что это происходит, как в крови, так и в центральной нервной системе (ЦНС). В то время как расширенные CD4⁺ Т-клетки в значительной степени специфичны для пептида MOG35-55, как и ожидалось, клонально расширенные CD8⁺ Т-клетки не реагировали на пептиды или белки миелина.

Чтобы идентифицировать целевые антигены, мы проверили шесть CD8⁺ TCR на библиотеке отображения молекулы МНС класса I H2-Db дрожжей р-МНС и получили суррогатные пептиды для двух из этих TCR. Мы обнаружили, что вместо того, чтобы усугублять ЕАЕ, они значительно уменьшают тяжесть. Дальнейшие анализы показывают, что эти Т-клетки представляют собой уникальное подмножество регуляторных CD8⁺ Т-клеток, которые подавляют специфическую пролиферацию CD4⁺ Т-клеток MOG35-55. Индукция аутореактивных CD4⁺ Т-клеток в ЕАЕ вызывает противодействующую волну регуляторных CD8⁺ Т-клеток. У недавно диагностированных пациентов с РС анализ TCR показал очень выраженные клональные расширения CD8⁺ Т-клеток в активированных, самонаводящихся в мозг Т-клетках и аналогичный перекоп в сторону фенотипа IL-17 в $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетках. Клональные расширения CD4⁺ были в целом скромными. Самое главное, представляется вероятным, что патогенные cd4⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеточные реакции, противостоящие регуляторным ответам CD8⁺ Т-клеток, являются распространенным явлением при аутоиммунных заболеваниях.

Результаты

Мобилизация трех различных типов Т-клеток после индукции ЕАЕ. Здесь мы провели широкое исследование динамики Т-клеток после индукции ЕАЕ в крови, селезенке, лимфатических узлах (LN) и инфильтрирующих лимфоциты ЦНС (фиг. 1а и 6). Мы наблюдали постепенное и значительное увеличение частоты общих CD4⁺ Т-клеток в крови со дня (D)0-D10 после иммунизации (PI), достигнув пика

около D10, снизившись до уровня ниже исходного уровня D15, с возможным восстановлением D17. Аналогичное падение и восстановление частоты общих CD4+ Т-клеток вновь наблюдалось на D19 и D21 соответственно (фиг. 1b). Кроме того, мы также наблюдали аналогичное значительное увеличение частоты общих CD8+ и $\gamma\delta$ + Т-клеток в крови при D10 PI, а кинетика и величина, с которой эти клетки уменьшаются и увеличиваются, точно соответствовали частоте CD4+ Т-клеток (фиг. 1b). Эта закономерность синхронного поведения в этих популяциях Т-клеток наблюдалась и в ЦНС (фиг. 1c). Селезеночные и LN Т-клетки демонстрировали различную картину синхронного поведения, с постепенным снижением частоты общих CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ + Т-клеток от D0-D7, повышением частоты до D17 и еще одним падением между D17 и D30 (фиг. 1d и 1e). Параллельно с этим наблюдались также соответствующие изменения частоты эффекторных клеток (CD44^{hi}CD6L^{low}) (фиг. 8a, 8c и 8e) и наивные клетки (CD44^{low}CD62L^{hi}) PI (фиг. 8b, 8d и 8f).

CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ + Т-клетки клонально расширяются после индукции ЕАЕ как в крови, так и в ЦНС. Чтобы определить, представляют ли эти волны Т-клеток сфокусированный иммунный ответ, мы выполнили одноклеточное парное секвенирование TCR (фиг. 2a) эффекторных (CD44^{high}CD6L^{low}) CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ + Т-клеток в различных временных точках (фиг. 2b и табл. 1). Все три типа Т-клеток показали повышенную клональную экспансию по мере прогрессирования заболевания, начиная с D7 (фиг. 2c и фиг. 9a-c)). Идентичные TCR были редки или отсутствовали между мышами, как и ожидалось, но мы обнаружили идентичные последовательности TCR, разделяемые между кровью и ЦНС в каждый день у каждой мыши, с максимальным разделением последовательностей на D15 (фиг. 9d). Среди $\gamma\delta$ + Т-клеток мы обнаружили, что почти все клонально расширенные и некоторые неклональные $\gamma\delta$ + Т-клетки в крови и ЦНС обогащаются для TCR, которые, как известно, экспрессируются естественными $\gamma\delta$ + Т-клетками (nT $\gamma\delta$ 17)13 (фиг. 9e) с уровнями, достигающими пика в D15, что составляет 96% от общего количества $\gamma\delta$ + Т-клеток в ЦНС (фиг. пункты 9e и 9f).

Клонально расширенные CD8+ Т-клетки не реагируют на миелиновые антигены. Чтобы определить, реагируют ли расширенные клоны CD4+ Т-клеток на пептид MOG35-55, мы экспрессировали четыре из этих CD4+ TCR (табл. 2) в клетках SKW $\alpha\beta$ ^{-/-} и окрасили их тетрамером MOG35-55 I-Ab пептида МНС. Все четыре из этих CD4+ TCR связаны с тетрамером (фиг. 3a-d), усиливая первенство MOG-специфических CD4+ Т-клеток при этом заболевании и подтверждая нашу стратегию секвенирования активированных/эффекторных клеток (CD44^{high}CD6L^{low}) как способ обогащения для клонально расширенных Т-клеток, важных в иммунном ответе.

Чтобы исследовать специфичность антигена (антигенов) CD8+ Т-клеток в ЕАЕ, мы экспрессировали девять клонально расширенных и общих CD8+ TCR в 58 $\alpha\beta$ ^{-/-} клетках (фиг. 10a и табл. 3). Эти CD8+ TCR (ЕАЕ1-CD8 до ЕАЕ9-CD8) культивировали совместно с дендритными клетками, полученными из костного мозга (BMDC), импульсными с пулами пептидов, полученных из миелинового белка (табл. 4), и их активация была измерена. Удивительно, но ни один из 350-миелиновых пептидов не стимулировал ни одну из клеточных линий CD8+ TCR (фиг. 3e). Клетки, экспрессирующие специфичный для овальбумина TCR (OT-1), культивируемые совместно с BMDC, загруженными пептидом SIINFEKL, полученным из овальбумина, давали надежную активацию (фиг. 3e и 10c), а также анти-CD3 + анти-CD28 стимуляция (фиг. 10b). Миелиновые белки также не стимулировали ни одну из клеточных линий CD8+ TCR, тогда как Т-клетки OT-1 были стимулированы белком овальбумина (фиг. 3e и расширенные данные фиг. 4c и 4d), предполагая, что очень немногие из активированных и клонально расширенных CD8+ Т-клеток, индуцированных во время ЕАЕ, специфичны для миелиновых антигенов.

Генерация библиотеки дрожжевого пептида H2-Db-МНС.

Недавно Гарсия и его коллеги разработали библиотечную систему дрожжевого пептида-МНС для идентификации лигандов $\alpha\beta$ TCR. Чтобы обнаружить пептидные антигены для этих TCR ЕАЕ-CD8, мы разработали конструкции H2-Kb и H2-Db, как описано ранее с пептидами SIINFEKL или SLENFRAYV (фиг. 11a и 11b). В то время как первоначальные конструкции были правильно направлены на поверхность дрожжей, они не связывались со своими родственными TCR, что указывает на неправильное складывание. Чтобы спасти правильное складывание, мы подвергли полноразмерную конструкцию H2-Kb и H2-Db подверженной ошибкам мутагенезу. Хотя это было неудачно с H2-Kb, мы обнаружили, что одна мутация H2-Db восстанавливает распознавание TCR (фиг. 11c и 11e-g) и, таким образом, мы сгенерировали две различные библиотеки пептидов с этой мутацией и мутагенизировали вставки 9 и 10 aa с ограниченным разнообразием в двух первичных МНС-связывающих анкерных остатках (фиг. 11a-d). Оценочное разнообразие для обеих библиотек пептидов составило 5X10⁸.

Иммунизация против пептидов класса I защищает мышей от ЭАЕ. Шесть из клонально расширенных TCR ЕАЕ-CD8 (табл. 3) были использованы для скрининга библиотек дрожжей H2-Db-pMHC. После четырех раундов отбора специфический контроль гриппа (6218), ЕАЕ6 и ЕАЕ7 TCR показал яркое окрашивание тетрамерами (фиг. 4a-c и табл. 5). Хотя мы получили идеальное соответствие с гриппом TCR и его известным пептидом (фиг. 4d), мы не нашли никаких совпадений в геноме мыши для двух пептидов ЕАЕ TCR. Тем не менее, они все еще могут служить важными суррогатами при комплексе с H2-Db.

Чтобы охарактеризовать эти суррогатные пептиды CD8 (SP), Jurkat $\alpha\beta$ ^{-/-} клетки, экспрессирующие

6218, EAE6 и EAE7-CD8 TCR, окрашивали соответствующими тетрамерами рМНС, обогащенными дрожжевой библиотекой (SSLENFRAYV для 6218, ASRSNRYFWL и SMRPNHFFFL для EAE6-CD8 и YQPGNWEYI для EAE7-CD8), которые показали яркое окрашивание (фиг. 12a). Более того, проанализировав обогащенные пептидные последовательности для EAE7-CD8 TCR, мы заметили, что 36-й обогащенный пептид (HDRVNWEYI) был очень похож на верхнеобогатенный пептид YQPGNWEYI. Клеточную линию EAE7-CD8 TCR окрашивали тетрамерами YQPGNWEYI и HDRVNWEYI H2-Db рМНС, которые показали надежное окрашивание тетрамерами (фиг. 12a).

Чтобы определить иммунный ответ, вызванный этими SP, мы иммунизировали мышей либо адьювантом (CFA + PTX), MOG35-55, всеми четырьмя пептидами вместе [YQPGNWEYI (YQP), HDRVNWEYI (HDR), ASRSNRYFWL (ASR) и SMRPNHFFFL (SMRP) SP иммунизация], либо MOG35-55 со всеми четырьмя пептидами вместе (иммунизация MOG + SP). 10D PI, селезенка и LN CD8+ Т-клетки были обогащены отдельно тетрамерами SP-H2-Db (фиг. 12). 10D PI, селезенка и LN CD8+ Т-клетки были обогащены отдельно тетрамерами SP-H2-Db (фиг. 12, 12b). Мы также обогащены тетрамером MOG-специфические CD4+ Т-клетки у мышей, иммунизированных MOG35-55. Иммунизация EAE вызвала MOG 35-55 специфические CD4+ Т-клетки (фиг. 5a и 5c). Мы обнаружили очень мало SP-специфических CD8+ Т-клеток у WT, MOG35-55 или адьювантных иммунизированных мышей. Однако при иммунизации MOG + SP частота CD8+ Т-клеток, специфичных для ASR, HDR и SMRP, увеличилась (фиг. 5b и 5d). По сравнению с мышами WT, иммунизация SP вызвала более высокую частоту CD8+ Т-клеток, специфичных для HDR и SMRP, без изменения количества специфических ASR и YQP CD8+ Т-клеток (фиг. 5b и 5d). Более высокая доля SP-специфических CD8+ Т-клеток проявляла активированные и эффектные фенотипы после иммунизации (фиг. 12b-d). Таким образом, эти SP идентифицируют ранее существовавший пул специфических CD8+ Т-клеток у мышей, которые могут быть активированы, а некоторые размножаются при иммунизации.

Чтобы проверить влияние этих пептидов на EAE, мы индуцировали EAE с или без SP. В то время как иммунизация MOG вызвала тяжелое заболевание у 100% мышей, добавление SP с MOG приводило к гораздо менее тяжелому или отсутствию заболевания, при этом только 30% случаев очень легкого заболевания, причем большинство мышей вообще не проявляли никаких симптомов (фиг. 5e и табл. 6). Иммунизация другой группы мышей MOG35-55 + пептидом гриппа не привела к существенной разнице в тяжести ЭАЕ (фиг. 12e). Мы проверили профилактический или терапевтический эффект этих пептидов в EAE путем иммунизации мышей SP за неделю до или после иммунизации MOG (MOG и SP проблема, соответственно), и с обеими этими проблемами у мышей было менее тяжелое заболевание (фиг. 5f и 5g и табл. 7). В целом, иммунизация MOG + SP значительно улучшает EAE.

Иммунизация пептидами класса I подавляет MOG35-55 специфические CD4 Т-клетки. Чтобы выяснить, влияет ли это снижение тяжести с добавлением SP непосредственно на MOG35-55 специфические CD4+ Т-клетки, мы проанализировали частоту MOG35-55 специфических CD4+ Т-клеток в селезенке и LN с тетрамером MOG35-55 I-Ab при иммунизации MOG или MOG + SP. Как и ожидалось, иммунизация MOG привела к увеличению количества MOG35-55 I-Ab тетрамер + CD4 + Т-клеток (фиг. 6a и 6b и фиг. 13a). Интересно, что наблюдалось значительное снижение частоты этих Т-клеток среди мышей, иммунизированных MOG+SP (фиг. 6a и фиг. 13b и 13c).

Чтобы изучить это искусственно, мы использовали фиолетовый краситель CellTrace™ (CTV) для маркировки CD4+ Т-клеток от мышей, иммунизированных MOG, которые были совместно культивированы и стимулированы с MOG35-55 в присутствии или отсутствии CD8+ Т-клеток, полученных от МЫШЕЙ, иммунизированных MOG + SP или SP, и величина пролиферации CD4+ Т-клеток была количественно определена. CD4+ Т-клетки активно размножались до MOG35-55 в отсутствие CD8+ Т-клеток (фиг. 6c). Однако добавление CD8+ Т-клеток от мышей, иммунизированных MOG + SP или SP, привело к значительному снижению пролиферативной способности CD4+ Т-клеток (фиг. 6d), что указывает на то, что любое состояние вызывает CD8+ Т-клетки, которые активно подавляют пролиферацию специфических CD4 + Т-клеток MOG35-55. Однако CD8+ Т-клетки либо из WT, MOG + пептид гриппа иммунизированы, либо из адьювантных иммунизированных мышей не подавляли MOG35-55 стимулированные CD4+ Т-клетки (фиг. 14a-d). Кроме того, индуцированные MOG + SP CD8+ Т-клетки не подавляли пролиферативную способность овалбумин-специфических CD4+ Т-клеток, предполагая, что подавление является антиген-специфическим (фиг. 14h).

Иммунизация пептидами класса I вызывает уникальное подмножество регуляторных CD8+ Т-клеток. Интересно, что мы обнаружили, что иммунизация MOG + SP и SP вызывает значительно более высокую частоту CD8+ Т-клеток, экспрессирующих CD44, CD122 и Ly49, которые, как полагают, являются маркерами для Qa-1b ограниченных регуляторных CD8+ Т-клеток (фиг. 6e). Более того, среди отдельных SP-специфических CD8+ Т-клеток наблюдалось значительное увеличение частоты CD8+ Т-клеток с этими маркерами (фиг. 13d-h). Мы обнаружили, что описанные здесь CD8-TCR EAE не ограничены Qa-1b, поскольку мы не видели никакого влияния антитела против Qa-1b на подавление CD8 MOG-специфических CD4 + Т-клеток (фиг. 14g).

Чтобы определить, могут ли CD8+ Т-клетки с этим фенотипом активно подавлять MOG35-55 специфические CD4+ Т-клетки искусственно, CD4+ Т-клетки из MOG иммунизированные были совместно

культивированы либо с общими CD8⁺ Т-клетками, либо очищенными CD8 + CD44 + CD122 + Ly49⁺ (Ly49⁺) или CD8 + CD44 + CD122 + Ly49⁻(Ly49⁻) Т-клетками от MOG + SP иммунизированных мышей. Мы обнаружили, что общее количество CD8⁺ Т-клеток, а также Ly49⁺ CD8⁺ Т-клеток от мышей, иммунизированных MOG + SP, подавляли специфическую пролиферацию CD4⁺ Т-клеток MOG35-55. Кроме того, мы усыновили Ly49⁺ и Ly49⁻ клетки мышам до индукции ЕАЕ и обнаружили, что клетки Ly49⁺ у мышей, иммунизированных MOG + SP, значительно снижали ЕАЕ без влияния на перенос Ly49⁻ клеток (фиг. 14i). Это показывает, что не только клетки Ly49⁺ могут подавлять CD4⁺ Т-клетки искусственно, но они также подавляют ЕАЕ в естественных условиях.

Мы также проверили влияние SP на другую модель аутоиммунного заболевания, экспериментальный аутоиммунный увеит (EAU). Мы индуцировали EAU у мышей C57BL6/J с использованием стандартных методов и сравнивали патологию EAU с мышами, иммунизированными человеческим интерферорецепторсвязывающим белком (IRBP) + SP. У мышей при иммунизации IRBP наблюдался мягкий воспалительный ответ у 40% (фиг. 15a и 15b). Интересно, что иммунизация IRBP + SP привела к более тяжелой воспалительной реакции у гораздо большей части мышей (80%) (фиг. 15c). Мы также провели анализы подавления искусственно, в которых мы обнаружили, что CD4⁺ Т-клетки надежно размножаются в отсутствие CD8⁺ Т-клеток у мышей, иммунизированных IRBP + SP (фиг. 15d), и ни Ly49⁺ CD8⁺ Т-клетки от мышей IRBP + SP не смогли подавить пролиферацию специфических CD4⁺ Т-клеток IRBP (фиг. 15e и 15f). Таким образом, СП ЕАЕ кажутся специфичными для этого заболевания.

Показано, что ограниченные регуляторные клетки Qa-1b опосредуют свое действие через перфорин, который важен для цитотоксичности. Чтобы проверить этот возможный механизм в нашей системе, мы совместно культивировали CD4⁺ Т-клетки у мышей, иммунизированных MOG35-55, с CD8⁺ Т-клетками, полученными от нокаутированных мышей Perform, иммунизированных MOG + SP, и обнаружили, что это полностью отменило их супрессивную способность (фиг. 14f). Кроме того, мы провели анализ RNA-seq SP-специфических CD8⁺ Т-клеток у мышей, иммунизированных MOG и MOG + SP, а также CD8⁺ (Ly49⁺ против Ly49⁻) Т-клеток у мышей, иммунизированных MOG + SP. Анализ обогащения геной онтологии дифференциально экспрессированных генов между Ly49⁺ и Ly49⁻ показал гены, участвующие в различных функциях Т-клеток (фиг. 16a и 16b и табл. 8).

Интересно, что SP-специфические CD8⁺ Т-клетки показали выраженную регуляцию генов Ly49, большинство из которых являются ингибирующими, в дополнение к генам рецепторов NK-клеток, и генов, связанных с CD8⁺ Т-клетками эффекторными функциями и функциями памяти (фиг. 6j). Кроме того, Ly49⁺ и SP-специфические CD8⁺ Т-клетки также экспрессируют многие гены, связанные с регуляторными CD4⁺ Т-клетками (фиг. 16c). В целом, наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что иммунизация SP вызывает CD8⁺ Т-клетки с регуляторным фенотипом, который подавляет патогенные MOG35-55 специфические CD4⁺ Т-клетки через цитотоксичность, что в конечном итоге приводит к устойчивости к ЕАЕ.

Параллели с рассеянным склерозом.

Чтобы определить, есть ли какое-либо сходство с РС, мы сначала определили частоту CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток непосредственно у недавно диагностированных пациентов с РС и не обнаружили различий в частоте общих Т-клеток в периферической крови по сравнению со здоровыми контрольными группами (HC) (фиг. 117a-c). Однако, когда мы выполнили одноклеточное секвенирование TCR активированных голов головного мозга (CD38 + HLA-DR + CD49d + CD29⁺) CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток из PBMCs недавно диагностированных пациентов с РС и HCs табл. 9), аналогичных ЕАЕ и целиакии, мы наблюдали массивное олигоклональное расширение CD8⁺ Т-клеток у пациентов с РС по сравнению с ГК (фиг. 18a). Мы также наблюдали только несколько олигоклональных расширений CD4⁺ Т-клеток у пациентов с рассеянным склерозом (фиг. 19a). Кроме того, мы обнаружили, что $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетки клонально расширены у пациентов с РС, а также у ГК (фиг. 20a).

Олигоклональные расширения $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток при РС были отмечены ранее. В отличие от мышинных pT $\gamma\delta$ 17 клеток, которые в значительной степени "предварительно запрограммированы" в тимусе, дифференцировка человеческих $\gamma\delta$ 17 Т-клеток и их TCR плохо изучена. Показано, что активация искусственно V γ 9+ δ 2⁺ Т-клеток специфическими агонистами TCR в присутствии цитокинов индуцирует экспрессию гамма-гамма-рецепторов, связанных с ROR(ROR γ), и продукцию IL-17. Фактически, мы обнаружили значительное увеличение частоты RORC-транскрипт-положительных $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток у пациентов с рассеянным склерозом (фиг. пункт 206). Таким образом, в хронических аутовоспалительных условиях, таких как РС, некоторые из этих расширенных $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток могут продуцировать IL-17 и способствовать патогенезу заболевания, как ЕАЕ.

Таким образом, мы показываем, что одновременная мобилизация олигоклональных CD4⁺, CD8⁺ и $\gamma\delta$ ⁺ Т-клеток имеет параллель не только у ЭАЕ, но и у вновь диагностированных пациентов с РС. Кроме того, когда мы систематически характеризовали каждый из этих типов клеток, мы обнаружили, что два из трех, вероятно, являются патогенными: в частности, $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетки, которые доминируют в ответе, хорошо известны как продуценты IL-17, провоспалительного цитокина, который, как известно, важен при патологии ЕАЕ, в то время как ответ CD4⁺ Т-клеток преимущественно MOG-специфический, клю-

чевой фактор патологии ЕАЕ.

В отличие от этих двух типов клеток клонально расширенные CD8⁺ Т-клетки проявляют регуляторную функцию. Эти Т-клетки имеют четкий фенотип и расширяют наблюдения, сосредоточенные на Qa-1b ограниченных регуляторных CD8⁺ Т-клетках, включая пептиды, представленные классической молекулой МНС класса I H2-Db.

Что еще более важно, наше исследование показывает ценность изучения специфичности и активности Т-клеток с "нуля", то есть идентификации Т-клеток, которые наиболее активны в данном ответе с помощью одной клетки, парного секвенирования TCR, использования как маркеров активации, так и клонального расширения в качестве ключевых индикаторов, а затем идентификации лиганда либо с библиотекой дрожжевого дисплея, либо с антигенами-кандидатами и репортерными клетками, трансфектированными соответствующими парами TCR. Это контрастирует с традиционными методами, которые обычно включают в себя знание (или угадывание), какие соответствующие антигены.

Таким образом, представленная здесь работа указывает на то, что существует подмножество CD8⁺ Т-клеток, которые могут подавлять патогенные CD4⁺ Т-клетки у мышей и у людей, и что это приводит к динамике совместной мобилизации при индукции заболевания. Определение лигандов для этих регуляторных CD8⁺ Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях имеет важное терапевтическое значение.

Методика

Лабораторные животные.

Самки мышей C57BL/6J (называемые либо B6, либо WT) и самки нокаутующих мышей Perform (Stock No: 002407) были приобретены в Лаборатории Джексона (Bar Harbor, ME, США). Экспериментальные процедуры, используемые в этом исследовании, были одобрены Комитетом по уходу за животными и их использованию Стэнфордского университета.

Образцы человека.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMCs) были получены из здоровых доноров крови из Стэнфордского центра крови. Здоровыми людьми были мужчины и женщины в возрасте 22-47 лет. PBMCs от пациентов с рассеянным склерозом были получены из Центра рассеянного склероза в Калифорнийском университете в Сан-Франциско (UCSF). Комитет по исследованиям человека в UCSF утвердил протокол, и информированное согласие было получено от всех участников. Подробная информация о популяции пациентов, включенных в исследование, представлена в виде табл. 9.

Генерация растворимых TCR.

Растворимые TCR были сгенерированы, как описано ранее. Переменные мышино-постоянные человеческие химеры (V_mCh) TCR, содержащие сконструированный дисульфид домена C, были клонированы в вектор экспрессии насекомых pAcGP67a (BD Biosciences, 554756), кодирующий либо C-концевой кислотный GCN4-zipper-Biotin acceptor peptide (BAP)-6xHis tag (для α цепи), либо C-концевой базовый GCN4 zipper-6xHis (для β цепи). Каждая цепочка также кодировала участок протеазы 3C между концом C эктодомейнов TCR и молниями GCN4, чтобы обеспечить расщепление молний. Бакуловирусы для каждой конструкции TCR были созданы в клетках SF9 путем совместной трансфекции BD baculogold лиnearизованной бакуловирусной ДНК (BD Biosciences, 554739) с Cellfectin II (Life Technologies, 10362-100). Вирусы TCRα и β цепи коинфицировали в небольшом объеме (2 мл) клеток High Five в различных соотношениях, чтобы найти соотношение, обеспечивающее 1:1 α:β стехиометрии.

Для получения растворимых TCR 1 л клеток High Five были инфицированы соответствующим соотношением вирусов TCRα и TCRβ в течение 48 ч при 28°C. Собранные питательные среды обусловливали 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM NiCl₂, 5 mM CaCl₂ и последующее осаждение очищали путем центрифугирования. Затем среду инкубировали с никель-NTA смолой (QIAGEN 30250) при комнатной температуре в течение 3 ч и элюировали в имидазоле 1xHBS + 200 mM (pH 7,2). Затем TCR подвергали биотинилированию, специфичному для сайта, путем добавления рекомбинантной бира-лигазы, 100 мкМ биотина, 50 mM Bisine pH 8,3, 10 mM АТФ и 10 mM ацетата магния и инкубации 4°C в течение ночи. Затем реакцию очищали с помощью хроматографии с исключением размера с использованием АКТАPurifier (GE Healthcare) на колонке Superdex 200 (GE Healthcare). Пиковые фракции были объединены, а затем протестированы на биотинилирование с использованием анализа сдвига геля SDS-PAGE. Белки обычно были на 100% биотинилированными.

Генерация мышинных дрожжей отображала библиотеку пептидов H2-Db, обогащение тегов, окрашивание и выделение. Дрожжевые конструкции одноцепочечного тримера (SCT) H2-Db синтезировали в виде N-концевых слияний с поверхностным белком дрожжей Aga2p. Полноразмерные конструкции SCT H2-Db были клонированы в вектор pYAL. Эти конструкции содержали лидерную последовательность Aga2p, за которой следовала пептидная последовательность 9-10MER, линкер Gly-Ser (GGGG)3, мышинная последовательность β2-микроглобулина (β2M), второй линкер глицина (GGGG)4, последовательность тяжелой цепи H2-Db мыши, эпитопная метка Мус или HA, третий глициновый линкер (GGGG)3 и белок Aga2. Затем конструкции SCT H2-Db МНС электропорировали в дрожжи EBY-100, как описано ранее, и индуцировали для экспрессии в среде SGCAA pH 4,5 при 20°C 24-72 ч до тех пор, пока не наблюдалось максимальное окрашивание эпитопной метки (обычно 40-70% от общей популя-

ции). Полноразмерная конструкция дрожжей H2-Db была мутагенизирована, как описано ранее. Вкратце, конструкция была мутагенизирована с помощью подверженной ошибкам ПЦР (Genemorph II kit, Agilent 200550), с конечной частотой ошибок ~ 4-5 нуклеотидных замен на kbp, о чем свидетельствует лигирование подверженных ошибкам конструкций в вектор pYAL и секвенирование клонов. Дрожжевые библиотеки были созданы путем электропорации компетентных клеток EBY-100 путем гомологичной рекомбинации линейаризованного вектора pYAL-cMyc/HA. Окончательные библиотеки содержали примерно 5×10^8 дрожжевых трансформантов.

Пептидные библиотеки были созданы таким же образом, как и библиотеки, подверженные ошибкам, за исключением того, что конструкции рМНС были рандомизированы вдоль пептида с использованием мутагенных праймеров, позволяющих всем 20 аминокислотам через кодон NNK, как описано ранее. Библиотеки допускали лишь ограниченное разнообразие известных остатков якоря МНС, чтобы максимизировать количество правильно сложенных и отображаемых клонов рМНС в библиотеке. Для анкеров H2-Db якоря P5 и P9 были ограничены Asn (N) и Met/Ile/Leu (M/I/L) с использованием кодонов AAC и MTS соответственно. Полученный продукт ПЦР использовали в качестве шаблона для второй реакции ПЦР, в которой 50 нуклеотидов последовательности, гомологичной вектору, добавляли на оба конца продукта ПЦР. Затем 50 мкг этого второго продукта ПЦР и ~10 мкг линейаризованного вектора очищали и использовали для электропорации дрожжей для создания каждой библиотеки. Перед выбором библиотек H2-Db 9MER и 10MER рМНС каждая из них была обогащена для соответствующей эпитопной метки, чтобы максимизировать процент дрожжей в исходном бассейне с правильно сложенными и отображаемыми молекулами рМНС, представленными на их поверхности. Для достижения этой цели каждая из библиотек была индуцирована отдельно в 500 мл SGCAA при 20°C в течение 24-72 ч с начальной плотностью 1×10^7 клеток/мл. Когда наблюдалось максимальное окрашивание эпитопной метки, примерно $1,4 \times 10^9$ индуцированных дрожжевых клеток промывали один раз в PBS + 0,5% BSA и 1mM EDTA (буфер PBE) и повторно суспендировали в 5 мл PBE с 200 мкл микрошариков Miltenyi streptavidin (Miltenyi, 130-048-101). Клеточную и шариковую смесь инкубировали при 4°C с вращением в течение 1 ч, снова промывали в ПБЭ, повторно суспендировали в 5 мл ПБЭ и пропускали через клеточный сетчатый фильтр на преевентную колонку MACS LD (Miltenyi 130-042-901). После того, как колонка полностью опорожнилась, ее дважды промывали 2 мл ПБЭ и собирали проточную трубу.

Клетки выделяли из проточного центрифугирования и повторно суспендировали в 5 мл ПБЭ с 80 мкл анти-cMyc AlexaFluor647 или анти-HA AlexFluor647 антитела (клеточная сигнализация, 2233 и 3444), соответственно инкубировали при 4°C с вращением в течение одного часа. Клетки промывали и повторно суспендировали в 5 мл ПБЭ, добавляли 220 мкл микрошариков Miltenyi anti-AlexaFluor647 (Miltenyi, 130-091-395) и эту смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин с вращением и защищали от света. Затем клетки промывали, повторно суспендировали в 6 мл PBE и равномерно делили между двумя предварительно влажными колоннами MACS LS (Miltenyi, 130-042-401). После того, как колонны полностью опустели, каждую колонну промывали два раза 3 мл ПБЭ, а проточный откладывался. Ячейки были элюированы из столбцов с 5 мл PBE на столбец. Небольшая часть элюата (5-20 мкл) была зарезервирована для сравнения окрашивания AlexaFluor647 с окрашиванием потока для количественной оценки обогащения метки. Остальные элюированные клетки были объединены, собраны центрифугированием, повторно суспендированы в общей сложности 40 мл среды SDCAA, а плотность клеток измерялась спектрофотометром при 600 нм. Затем плотность клеток корректировали до OD или менее с добавлением SDCAA, и дрожжи культивировали при 30°C в течение ночи. Клетки были пройдены для еще одного раунда ночного роста в SDCAA.

Для индукции метки элюат брали для культивирования при 20°C в 500 мл SGCAA. Чтобы окрасить рМНС тетрамерами TCR, биотинилированный TCR инкубировали со стрептавидином, связанным с AlexaFluor647, AlexaFluor488 или фикоэритрином в соотношении 5:1 в течение 5 мин на льду, чтобы обеспечить полное образование тетрамера. Затем дрожжевые клетки окрашивали тетрамером 250 нМ + анти-Myc-AlexaFluor488 или анти-HA-AlexaFluor488 (Cell Signaling, 2279 или 2350, соответственно) в течение 3 ч

на льду и дважды промывали ледяным буфером PBE перед анализом с помощью проточной цитометрии (проточный питомерт Assuigi C6). Весь отбор дрожжей и секвенирование библиотек дрожжей были сделаны так, как описано ранее.

Список буквараей, используемых для библиотек H2-Db. Для генерации библиотек, подверженных ошибкам H2-Db:

Прямой праймер:

5'TGCAGTTACTTCGCTGTTTTTTTTTTTCAATTTTTTCTCTCTCGTTTTAGCAAGCAGCCTGGAGAACTT
CAGAGCCTACGTGG-3'

Реверс: 5'-GAACAAAAGCTTATCTCCGAAGAAGACTTG-3'.

Для случайной библиотеки H2-Db:

Прямой праймер для библиотеки 9MER HA (начальная рандомизация ПЦР):

5'-TCAATATTTTTCTCTGTTATTGCTAGCGTTTTAGNKNNKNNKNNKNNKKAACNNKNNKNNK

MTSGGTGGGGAGGAGGGG-3'.

Обратный праймер для библиотеки 9MER HA (начальная рандомизация ПЦР):

5'-TCCACCACCACCAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGTAGTAGCCCCCA-3'.

Добавить перекрытие для гомологичной рекомбинации с линейаризованным вектором pYAL:

Прямая грунтовка: 5'-ATTTTCAATTAAGATGCAGTACTTTCGCTGTTTTTCAATTTTTCTCTCTGTTATTGCTAGCGTTTTAGCA-3'.

Обратная грунтовка:

5'-TCCACCACCACCAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGTAGGATCCCTCCCA-3'.

Производство пептидных мономеров класса I и II, тетрамеризация и обогащение тетрамерами. Производство мономера Peptide-I-Ab: мономер пептида I-Ab был получен, как описано ранее. Вкратце, внеклеточная часть цепи I-Ab α была связана с кислотной молнией на C-конце, за которой следовали AviTag (GLNDIFEAQKIEWNE) и 6X Гистидиновая метка. Пептиды - миелиновый олигодендрогликопротеин (MOG) 38-48 (GWYRSPFSRVV) или овальбумин (OVA) 327-337 (VHAANAINEA) были привязаны к N-концу цепи I-Ab β , за которой следовала основная молния и 6X гистидиновая метка. "Дисульфидная ловушка" вводится путем окисления цистеина в положении p+2 и цистеина в положении 72 I-Ab α цепи, мутировавшей из валина для обеспечения надлежащего регистра связывания пептидов.

Цепь α и пептидно- β цепи были клонированы отдельно в векторы pAcGP67A компанией Gibson Assembly (New England Biosciences, E2611S). Бакуловирусы для каждой конструкции были созданы в клетках SF9 путем совместной трансфекции BD baculogold линейаризованной бакуловирусной ДНК (BD Biosciences, 554739) с Cellfectin II (Life Technologies, 10362-100). Вирусы α и β цепи были коинфицированы в небольшом объеме (2 мл) клеток High Five в различных соотношениях, чтобы найти соотношение, обеспечивающее стехиометрию 1:1 α : β .

Для получения растворимых мономеров 1 л клеток High Five были инфицированы соответствующим соотношением α и β вирусов в течение 48 ч при 28°C. Собранные питательные среды обуславливали 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ NiCl₂, 2,5 мМ CaCl₂ и последующее осаждение очищали путем центрифугирования. Затем среду инкубируют с никель-NTA смолой (QIAGEN, 30250) при комнатной температуре в течение 3 ч и элюируют в имидазоле 1×HBS+200 мМ (pH 7,2). Затем TCR подвергали биотинилированию, специфичному для сайта, путем добавления рекомбинантной бира-лигазы, 100 мкМ биотина, 50 мМ Bicine pH 8,3, 10 мМ АТФ и 10 мМ ацетата магния и инкубации 4°C в течение ночи. Затем реакцию очищали с помощью хроматографии с исключением размера с использованием АКТАPurifier (GE Healthcare) на колонке Superdex 200 (GE Healthcare). Пиковые фракции были объединены, а затем протестированы на биотинилирование с использованием анализа сдвига геля SDS-PAGE. Белки обычно были на 100% биотинилированными.

Производство мономера Peptide-H2-Db: Мономеры пептида H2-Db были повторно свернуты соответствующим пептидом и человеческим β 2-микроглобулином, как описано ранее. Вкратце, H2-Db и человеческий β 2-микроглобулин были отдельно экспрессированы в BL21DE3 (ThermoFisher, C600003) в виде тел включения. В конструкции H2-Db цепочка α H2-Db была связана с тегом AviTag и 6X Histidine. Повторное складывание проводили с помощью быстрого разбавления. После биотинилирования BirA белок очищали с помощью размерно-эксклюзионной хроматографии (Superdex 200 10/300 GL) и хранили в -80°C. Для YQPGNWEYI (YQP), HDRVNWEYI (HDR), ASRSNRYFWL (ASR) и SMRPNHFFFL (SMRP) мы индивидуально повторно складывали мономеры и очищали их. Для пептидного мономера H2-Db 6218 пептидов гриппа (QGLSNMRVRL, VGLENMRVRL, VSLRNMRSYL и SLENFRAYV) мы повторно свернули H2-Db с фоторасщепляемым пептидом (FAPGNY-Anp-AL) и обменяли целевые пептиды на H2-Db при УФ-расщеплении FAPGNY-Anp-AL45.

Образование тетрамера пептид-МНС: Все тетрамеры были свежеприготовлены, как описано ранее. Вкратце, для тетрамеризации количество флуорофор-конъюгированного стрептавидина и мономера рМНС смешивали с молярным соотношением 4:1. Одну пятую часть флуорофор-конъюгированного стрептавидина добавляли в раствор мономера каждые 10 мин при комнатной температуре.

Обогащение тетрамер-положительных Т-клеток у мышей и клеточных линий: Одноклеточные суспензии селезенки и LN-клеток получали из неиммунизированных или иммунизированных мышей, повторно суспендированных в буфере FACS 200 мкл (Ca₂⁺/Mg₂⁺ - свободный стерильный PBS с 0,5% BSA, 0,5 мМ ЭДТА) с блоком Fc (1:100) и 10 мкМ биотина. Для окрашивания клеток использовались следующие концентрации тетрамеров: тетрамер I-Ab-MOG38-48 (15 нМ), тетрамер I-Ab-OVA327-337 (15 нМ), тетрамер H2-Db-ASR (25 нМ), тетрамер H2-Db-SMRP (10 нМ), тетрамер H2-Db -YQP (25 нМ) и тетрамер H2-Db-HDR (25 нМ). Клетки окрашивали тетрамером в течение часа при комнатной температуре и промывали буфером FACS. Для тетрамеров I-Ab-MOG38-48 и I-Ab-OVA327-337 обогащение тетрамер-положительных клеток осуществлялось с помощью EasySep™ PE Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies, 18557). Если клетки окрашивали как тетрамерами I-Ab, так и тетрамерами H2-Db, обогащение тетрамерположительных клеток осуществлялось с использованием анти-PE микрошариков (Miltenyi Biotec, 130-048-801) и анти-Его микрошариков (Miltenyi Biotec, 130-094-258) в соответствии с инструкциями производителя.

После обогащения тетрамерами клетки окрашивали поверхность коктейлем антител в течение 20 мин при 4°C. Окрашенные клетки промывали с использованием буфера FACS и анализировали на LSR II (Becton Dickinson) или одноклеточные отсортированные/объемные отсортированные на FACS Aria Fusion SORP (Becton Dickinson). Лентивиально TCR трансдуцированные Jurkat TCR $\alpha\beta^{-/-}$ клеточные линии окрашивали тетрамерами в концентрации 20 нМ в буфере FACS с 10 мкМ биотина в комнатном умеренном состоянии в течение 1 ч с последующим окрашиванием поверхности соответствующими антителами в течение 20 мин 4°C. После поверхностного окрашивания клетки промывали буфером FACS и анализировали на LSR II (Бектон Дикинсон).

Секвенирование и анализ данных TCR для одноклеточной мыши и человека

Все используемые человеческие праймеры TCR были ранее опубликованы. Все последовательности праймеров TCR мыши представлены в табл. 1. Секвенирование TCR проводилось в соответствии с ранее установленными протоколами.

Индукция и оценка ЕАЕ. ЕАЕ активно индуцировался у мышей C57BL/6J в соответствии с ранее установленным протоколом. Вкратце, для индукции ЕАЕ мышей вводили подкожно в заднюю правую и левую боковую эмульсию, содержащую 200 мкг MOG35-55 или CD8 специфических SP, полученных из дрожжевой библиотеки ASRSNRYFWL, SMRPNHFFFL YQPGNWEYI и HDRVNWEYI, и равный объем полного адьюванта Фройнда (CFA; Sigma-Aldrich, F5881) с добавлением 200 мкг микобактерий туберкулеза H37Ra (Difco Laboratories, 231141). В день иммунизации и через 2 дня после иммунизации каждая мышь получала 200 нг PTX (List Biological Laboratories, 180) путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей ежедневно оценивали по клиническим признакам ЕАЕ, начиная с d5 после инъекции следующим образом: 0, отсутствие клинической экспрессии заболевания; 1, вялый хвост без слабости задних конечностей; 2, слабость задних конечностей; 3, полный паралич задних конечностей и флорпи-хвост; 4, паралич задних конечностей, сопровождающийся висачим хвостом и недержанием мочи или кала; и 5, умирающий. Клинические количественные переменные признаков оценивались, как описано ранее.

Инфильтрирующая ЦНС моноклеарная изоляция клеток. Инфильтрирующие клетки ЦНС были выделены в соответствии с ранее установленным протоколом. Вкратце, в разные дни после иммунизации животных перфузировали физиологическим раствором, удаляли головной и спинной мозг. Одноклеточную суспензию получали и пропускали через 70-мкм сетчатый фильтр. Моноклеарные клетки получали методом центрифугирования градиента Перколла (37%/70%) и собирали из интерфазы. Клетки промывали, мечили антителами, конъюгированными с фторхромными красителями, и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Экспрессия TCR, H2-Db и Qa-1b путем лентивирусной трансдукции

Конструкции TCR α , β , H2-Db и β 2M были клонированы в лентивирусную конструкцию. Для экспрессии TCR альфа- и бета-лентивирусные конструкции TCR трансфектировали в клетки 293X отдельно. Вирус был собран после 72 ч трансфекции и трансдуцирован в Jurkat $\alpha\beta^{-/-}$ или SKW $\alpha\beta^{-/-}$ клетки. Клетки SKW или Jurkat были обогащены для максимальной экспрессии TCR $\alpha\beta$ с использованием анти-APC селекции Miltenyi (Miltenyi 130-090-855). Аналогичная стратегия использовалась для экспрессии H2-Db и β 2M, за исключением того, что T2-клетки использовались для трансдукции и экспрессии.

Анализ стимуляции Т-клеток

Анализ стимуляции Т-клеток проводился так, как описано ранее. Все эксперименты по стимуляции пептидов Т-клеток проводились в 96 круглых нижних пластинах с общим объемом 200 мкл. Клетки T2, K562 или БМДК пульсировали 10-100 мкг пептидов в течение 45 мин, промывали один раз и покрывали (10000 клеток/колодец). Клеточные линии, экспрессирующие TCR (100000 клеток/колодец), были совместно культивированы с APC в течение 18 ч. В конце стимуляции клетки собирали, промывали и окрашивали TCR β , человеческим CD3 и CD69 и анализировали на LSR II (Бектон Дикинсон) для активации.

Анализ пролиферации/подавления искусственно. Клетки селезенки и LN были собраны у WT или иммунизированных мышей. Готовили одноклеточные суспензии, а эритроциты лировали с использованием буфера лизиса Ack (ThermoFisher scientific A1049201). Всего CD4⁺ (Miltenyi 130-049-201) и CD8⁺ (Miltenyi 130-049-401) Т-клетки были положительно очищены с использованием наборов Miltenyi в соответствии с установленным протоколом производителя с последующей сортировкой FACS. Аналогичным образом, клетки, представляющие антиген, были выделены с использованием изоляционного набора Miltenyi Pan Dendritic Cell (DC) (Miltenyi 130-100-875). После обогащения CD4⁺ Т-клеток клетки были подсчитаны и помечены фиолетовым красителем CellTrace™ (ThermoFisher scientific C34557) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ пролиферации/подавления были созданы искусственно в соответствии с ранее опубликованным протоколом. Вкратце, меченые CD4⁺ Т-клетки были совместно культивированы либо с CD8⁺ Т-клетками (соотношение 1: 1, 0,25X10⁶ клеток / хорошо), либо без CD8⁺ Т-клеток в присутствии пан DC (0,75X10⁶ клеток/хорошо). В некоторых экспериментах по подавлению клетки были предварительно включены в 10 мкг/мл анти-Qa-1b нейтрализующего антитела (6A8.6F10.1A16, BD Biosciences). Клетки культивировали в общем объеме 200 μ l в 96-луночной круглой донной пластине. CD4⁺ Т-клетки стиму-

лировали либо MOG35-55, либо нет. На 7-й день клетки промывали и окрашивали поверхностными антителами и анализировали на LSRII (Бектон Дикинсон).

Приемный перевод

ЕАЕ активно индуцировали у C57BL/6J, мышей активно иммунизировали эмульсией, содержащей 200 мкг MOG35_{.55} + CD8 специфических PPT, полученных из дрожжевой библиотеки (ASRSNRYFWL, SMRPNHFFFL YQPGNWEYI и HDRVNWEYI), и равным объемом полного адьюванта Фройнда (CFA; Sigma-Aldrich, F5881) с добавлением 200 мкг микобактерий туберкулеза H37Ra (Difco Laboratories, 231141). В день иммунизации и через 2 дня после иммунизации каждая мышь получала 200 нг РТХ (List Biological Laboratories, 180) путем внутрибрюшинной инъекции. На 10-й день после иммунизации были собраны селезенки и лимфатические узлы, cd8+ клетки были получены с использованием набора для обогащения CD8 и отсортированы по клеткам CD44 + CD 122 + Ly49 + (Ly49 +) и CD44 + CD122 + Ly49- (Ly49-).

Очищенные FACS Ly49+ и Ly49-клетки (8 млн клеток / мышей) были адаптированы во время активной иммунизации MOG, и мышей ежедневно оценивали на клинические признаки ЕАЕ, начиная с 5-го дня после того, как описано ранее.

Индукция и оценка ЕАУ. Экспериментальный аутоиммунный увеит (ЕАУ) был индуцирован у мышей, как описано ранее. Вкратце, для индукции ЕАЕ мышей вводили подкожно в заднюю правую и левую боковую часть эмульсией, содержащей 300 мкг пептида интерфоторецепторсвязывающего белка человека (IRBP) 1-20 в CFA (1:1 v/v), 0,2 мкг РТХ на 0-й день и 0,2 мкг снова на 2-й день. Мышей усыпили на 21-й день после иммунизации. Мышиные глаза были энуклеированы, зафиксированы, а зрочно-зрительные нервные отделы были исследованы гистологией, как описано ранее.

Секвенирование всего транскриптома и анализ данных

Секвенирование всего транскриптома производилось так, как описано ранее, Т-клетки массово сортировали непосредственно в ТРИЗОЛ (Qiagen). РНК экстрагировали с помощью микрокомплекта RNeasy Plus (Qiagen). После анализа на биоанализаторе 2100 и полученная в результате библиотека была секвенирована на платформе HiSeq 4000 (Illumina). Для каждого образца во всей библиотеке секвенирования транскриптомов из секвенсора было получено 75 парных считываний basepair. Каждое условие образца было выполнено в трех экземплярах, за исключением образца WT, для которого был сгенерирован один образец. Качество считывания определялось с помощью FastQC 0.11.4. Используя TopHat v2.0.13, мы выравнивали показания с эталонным геномом мыши (NCBI/сборка GRCm38). В среднем 90% считываний были согласованы с эталонным геномом. Один образец MOG + SP был удален из последующего анализа как идентифицированный выброс. Дифференциальный анализ экспрессии генов и нормализация количества считываний, используемые в качестве входных данных для тепловых карт, были определены с помощью DESeq251. Значения доверенного платформенного модуля были рассчитаны с помощью RSEM v1.3.052. Тепловые карты были сгенерированы с помощью пакета R "pheatmap" 53. Графики анализа геномной онтологии были сгенерированы с помощью пакета R "enrichplot".

Доступность данных

Данные RNA-seq и данные о селекции рМНС дрожжей хранятся в хранилище сводных данных по экспрессии генов (GEO) с регистрационным номером GSE130975. Приведены исходные данные для каждого рисунка.

Таблица 1

Список праймеров TCR для мыши Фазы 1	
musTRBV1Ph1	GGGACAAAGAGGTCAAATCTCTTC
musTRBV2Ph1	CCTCAAGTCGCTTCCAACSTCAA
musTRBV3Ph1	GTCATGGAGAAGTCTAAACTGTTTAA
musTRBV4Ph1	CTCATTGTAACGAAACAGTTCCAA
musTRBV5Ph1	CGAAATGAGACGGTGCCAGTC
musTRBV12-1,2Ph1	CCCAGCAGATTCTCAGTCCAACA
musTRBV13-1Ph1	GGAGATGTCCTGTATGGGTACAA
musTRBV13-2,3Ph1	AGATATCCCTGATGGRTACAAGGCC
musTRBV14Ph1	GGCCTAAAGGAACTAACTCCAATC
musTRBV15Ph1	GGTGGGGCTTCAAGGATCGATT
musTRBV16Ph1	GATGATTCAGGGATGCCAAGGAA
musTRBV17Ph1	GGAAGCTGACACTTTTGAGAAGT
musTRBV19Ph1	GATCTATCTGAAGGCTATGATGCGT
musTRBV20Ph1	CTGTGAACTCAGCAATCAAAATATGAA
musTRBV23Ph1	GGTCAAGGAGAGATTCTCAGCTGT
musTRBV24Ph1	CAGACTTGGTCAAGAAGAGATTCTCA
musTRBV26Ph1	GTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGA
musTRBV29Ph1	CGATGTTGATAGTAACAGCGAAGGA
musTRBV30Ph1	GCCACATACGAGAGTGGATTAC
musTRBV31Ph1	GGTAGAGTCGGTGGTCAACTGA
musTRAV21Ph1	GACTCACGGTCTACAACAAAATACAA
musTRAV19Ph1	CCGTACGCTCAAATGTGGATAAGA
musTRAV17Ph1	CGTTGTTAAAGGCACCAAGGGCTT
musTRAV16Ph1	GGTCATTATYCTCTGAACTTTCAGAAGC
musTRAV15Ph1	CGTAYTCTGTAGTCTTCCAGAAATCA
musTRAV14Ph1	GTGTCCRATAAAAAGGAAGATGGA
musTRAV13-1/4Ph1	GTTSTACAATCCTTCTGGGACAAAGCA
musTRAV13-2/4Ph1	CAATCCTTCTGGGACAAAGCACAC
musTRAV13-3/D3/N3Ph1	GCAGAGCAGAGAGGTGGAAAGACT
musTRAV13-5.01Ph1	GCCTGTCCTACATTCCTGGAATGA
musTRAV12Ph1	CGCCTCTCCATAAGAGCAGCA
musTRAV11Ph1	GACAAAACGTCAAATGGGAGATACTC
musTRAV10Ph1	GGACAGAAAACAGAGCCAAAGACTT
musTRAV9Ph1	GGARACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAA
musTRAV8Ph1	CGTTCAAATGAGMGAGAGAAGCGCA
musTRAV7-5Ph1	CTCTGATGGTGAAAAGGAAGAAGGCA
musTRAV7-4Ph1	GAAGGCAGATTACAGCTCACCT
musTRAV7-6Ph1	GGCAGATTGACAGTTTACCTCAATA
musTRAV7-3Ph1	AGATTCACAATTCACCTCAATAAAGC
musTRAV7-2Ph1	GGTGAAAAGGAAGAAGGCAGATTCA
musTRAV5-4Ph1	GCAGACCCAAGGACTCATCGTTTT
musTRAV5-1.01Ph1	GAAAACAGAATCAAAGACTCACCTT
musTRAV4Ph1	CAGGAACAAAGGAGAATGGGAGGT
musTRAV4-2Ph1	GCTCAAGGAACAAAGGAGAATGGAA
musTRAV4-4Ph1	GCTTCAGGAACAAAGGAGAATGGGA
musTRAV3-3Ph1	CGGAAATAAACGAAGGACAAGGATT
musTRAV3-1,4Ph1	GTGGACAGAAAAGAAGAACAAGGAC
musTRAV2Ph1	GGACTATGTGGTAAATGAAGTGGCA
musTRAV1Ph1	GAAGGACAGTGGGCATTTCTCCA
musTRBCPh1	GCACACGAGGGTAGCCTTTTGTTT
musTRACPh1	GTCAAAGTCGGTGAACAGGCAGA

Список праймеров TCR для мыши Фазы 2

musTRBV1Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGGGTCAGTACGGAgctga
musTRBV2Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCATTTAGACCTTCAGATCACAGCT
musTRBV3Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGGATCAGTTTTTCAGTTGAAAGACCA
musTRBV4Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCCTCAGTCTTCAGATAAAGCTCATTT
musTRBV5Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCCAGACAGCTCCAAGCTACTT
musTRBV12-1,2Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCAACAGTTTGATGACTATCACTCT
musTRBV13-1Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCCACCAGAACAACGCAAGAAGA
musTRBV13-2,3Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAAGGCCTCCAGACCAAGCCAA
musTRBV14Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGGCCTAAAGGAACTAACTCCACTC
musTRBV15Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCTGAGATGCTAAATTCATCCTCT
musTRBV16Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCTCAGATGCCCAATCAGTCGCA
musTRBV17Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAGTCGGCCTAACAAATCTTTCT
musTRBV19Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCGAGAGAAGAAGTCATCTTTTTCTCT
musTRBV20Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCATCAGTTCATCCCAACTATCCT
musTRBV23Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCCTCCAGCTCACTCTGCAGCCT
musTRBV24Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAGCTAAGTGTCTCCTCGAACTCaC
musTRBV26Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCTGAGTGTCTTCAAACCTCACCT
musTRBV29Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGGATACAGGGTCTCACGGAAGAA
musTRBV30Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAAGTTTCCAATCAGCCGGCCAAA
musTRBV31Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCTTCCAGGCCGAAGGACGAC
musTRAV21Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCCTGGCTATTGCCTCTGACAGAAA
musTRAV19Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAGTTTTCTTGAACAAAAGCGGCAAA
musTRAV17Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCCGAGTTTAGGAAGAGTAACTCCTCT
musTRAV16Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAGAAGCCAAAAGTTCATCGGA
musTRAV15N1Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACTCAAATCCATCAGCCTTATCATTTCA
musTRAV15Ph3	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAARTCCATCAGCCTTgTCATTTCA
musTRAV14Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGATTCACAATCTTCTTCAATAAAAGGGAG
musTRAV13Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCGCRGCTCTTTCACATTTCCCTCT
musTRAV13-5.01Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCCTCAACAGTCACTAAGGGACGT
musTRAV12Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAGCTCCTTCCATCTGCAGAAGT
musTRAV11Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCTCAGCAACTCTGGATAAAGATGCTA
musTRAV10Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACTGGATAAGAAAGCCAAAACGATTCTC
musTRAV9Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCTTYGAGGCTGAGTTCAGCAAGAG
musTRAV8Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGAGCCACCCTTGACACYTCCAGC
musTRAV7-5Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACTTACAGCTCACCTCAATAGAGCCA
musTRAV7-5.02Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCAGCTCAGGTCAATAGAGCCAGCCT
musTRAV7-4Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCTCACCTCAATAAGGCCAGCCTG
musTRAV7-6Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACTCAATAGAGCCAGCCTGCATGTT
musTRAV7-3Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACTCAATAAAGCCAGTCTGCATTTCTC
musTRAV7-2Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCCAGCCTGCATACTTCCCTGCA
musTRAV5-4Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGGATAAGAAAGCCAAAACGCTTCTC
musTRAV5-1.01Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACAGAAAACCAAACACCTTTCCCTGCA
musTRAV4Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGGTTAAAGTCAACATTCAATTCTAAGGA
musTRAV4-4Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCTAAAGTCAAGTCAATTGATTCTAAGGA
musTRAV3Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCACTGTCTACTGAACAAGAAAGACAA

musTRAV2Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACCATCTCTGTTTATCTCTGCTGACCCGGA
musTRAV1Ph2	CCAGGGTTTTCCAGTCACGCCGCTCGAATGGGTACAGTTAC
musTRBCPh2	CTGCTTTTGATGGCTCAAACAAGGA
Список праймеров штрих-кодов 3-й фазы TCRA и TCRB для мыши	
musTRACPh2	CCTGAGACCGAGGATCTTTAACTG
musBetaBC1	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTatGTTACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC2	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTtaCAGGACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC3	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTgaTTATACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC4	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTcaCCTGTCCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC5	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTagACCGCCCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC6	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTigACTTACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC7	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTgtGCTAGCCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC8	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTctGACGTCCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC9	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTacGGCTACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC10	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTcGAATGCCCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC11	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTgcCCAACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musBetaBC12	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTcgGAGACCTTGGGTGGAGTCACATTCT CA
musAlphaBC1	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTatGTTACAGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC2	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTtaCAGGAGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC3	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTgaTTATAGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC4	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTcaCCTGTGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC5	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTagACCGGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC6	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTigACTTAGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC7	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTgtGCTAGGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC8	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTctGACGTGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC9	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTacGGCTAGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC10	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTcGAATGGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC11	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTgcCCAACGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT
musAlphaBC12	CTGCTGAACCGCTCTCCGATCTcgGAGACGTACACAGCAGGTTCTGGGTTCT

Таблица 2. Последовательности EAE-CD4 TCR, используемые для трансдуктантов Т-клеток и растворимых TCR

Мышь/Ткань/День	Vbeta	beta-CDR3	Jbeta	Valpha	Jalpha	alpha-CDR3	freq	
EAE1 -CD4	M2/CNS/D15	mTRBV13-2	CASGDAGGGQ NLYF	mTRBJ 2-4	mTRAV7N- 4	mTR AJ15	CAASEQGGRAL IF	1(9%)
	M3/CNS/D15	mTRBV13-2	CASGDAGGGQ NLYF	mTRBJ 2-4	mTRAV7N- 4	mTR AJ15	CAASEVQGRAL IF	2(9%)
	M1/BL/D7	mTRBV13-2	CASGDAGGGQ NLYF	mTRBJ 2-4	mTRAV7N- 4	mTR AJ15	CAASEQGGRAL IF	1(9%)
	M3/BL/D7	mTRBV13-2	CASGDAGGGQ NLYF	mTRBJ 2-4	mTRAV7N- 4	mTR AJ15	CAASEQGGRAL IF	1(9%)
	M3/BL/D15	mTRBV13-2	CASGDAGGGQ NLYF	mTRBJ 2-4	mTRAV7N- 4	mTR AJ15	CAASEVQGRAL IF	4(9%)
EAE2 -CD4	M3/CNS/D15	mTRBV16	CASSLDQGD ERLFF	mTRBJ 1-4	mTRAV12- 1	mTR AJ23	CALRNYNQGLI F	2(9%)
	M3/BL/D15	mTRBV16	CASSLDQGD ERLFF	mTRBJ 1-4	mTRAV12- 1	mTR AJ23	CALRNYNQGLI F	4(9%)
EAE3 -CD4	M2/CNS/D15	mTRBV3	CASSLEGHQD TQYF	mTRBJ 2-5				1(9%)
	M2/BL/D15	mTRBV3	CASSLEGHQD TQYF	mTRBJ 2-5	mTRAV14D -1	mTR AJ43	CAASGANNNAP RF	4(9%)
EAE4 -CD4	M3/CNS/D15	mTRBV16	CASSLETANTE VFF	mTRBJ 1-1	mTRAV3N- 3	mTR AJ30	CAVSAGTNAYKV IF	5(9%)

Список пар CD4 TCR, используемых для создания репортерных клеточных линий. Мышь (M1, M2 и M3), кровь (BL) и D, день.

Таблица 3.

В последовательностях EAE-CD8 TCR использовались трансдуктанты Т-клеток и растворимые TCR

Мышь/Ткань/День	Vbeta	beta-CDR3	Jbeta	Valpha	Jalpha	alpha-CDR3	freq	
EAE1 -CD8	M2/CNS/D15	mTRBV1	CASSQKNTGQLY	mTRBJ 2-2	mTRAV1 3-2	mTRAJ 26	CALEHNYAQLT F	28(96)
EAE2 -CD8	M1/CNS/D15	mTRBV1	CASSPGQVSNER LFF	mTRBJ 1-4	mTRAV1 2-2	mTRAJ 40	CALRPPGAGNYK YVF	8(96)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASSPGQVSNER LFF	mTRBJ 1-4	mTRAV8 D-2	mTRAJ 34	CATDPTNKVVF	5(96)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASSPGQVSNER LFF	mTRBJ 1-4	mTRAV8 -1	mTRAJ 23	CATDMNYNQGK LIF	1(96)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASSPGQVSNER LFF	mTRBJ 1-4	mTRAV1 2-2	mTRAJ 7	CAPGYSNNRLL TL	1(96)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASSPGQVSNER LFF	mTRBJ 1-4	mTRAV1 2-2	mTRAJ 42	CALGGSNAKLTF	1(96)
EAE3 -CD8	M1/CNS/D15	mTRBV1	CASSPTDANTEV FF	mTRBJ 1-1	mTRAV1 2-2	mTRAJ 43	CALSDPGNNAP RF	12(96)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASSPTDANTEV FF	mTRBJ 1-1	mTRAV1 2-2	mTRAJ 22	CALSESSGSQLI F	1(96)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASSPTDANTEV FF	mTRBJ 1-1	mTRAV1 2-1	mTRAJ 23		1(96)
EAE4 -CD8	M3/CNS/D10	mTRBV1	CASSLNPGANTE VFF	mTRBJ 1-1	mTRAV7 -3	mTRAJ 9	CAVNSSNMGYK LTF	11(43)
	M3/BL/D10	mTRBV1	CASSLNPGANTE VFF	mTRBJ 1-1	mTRAV7 -3	mTRAJ 9	CAVNSSNMGYK LTF	6(68)
EAE5 -CD8	M1/CNS/D15	mTRBV4	CASSYWGSYE QYF	mTRBJ 2-7	mTRAV1 2-2	mTRAJ 31	CAVDSNYQLIW	8(96)
EAE6 -CD8	M3/CNS/D10	mTRBV1	CASSITPLGGLET LYF	mTRBJ 2-3	mTRAV1 2-1	mTRAJ 31	CALSDYNRIFF	2(43)
	M3/BL/D10	mTRBV1	CASSITPLGGLET LYF	mTRBJ 2-3	mTRAV1 2-1	mTRAJ 31	CALSDYNRIFF	4(68)
EAE7 -CD8	M1/CNS/D15	mTRBV1	CASTNRGEVFF	mTRBJ 1-1	mTRAV5 D-4	mTRAJ 45	CAASVNTGADR LTF	4(96)
	M1/BL/D15	mTRBV1	CASTNRGEVFF	mTRBJ 1-1	mTRAV5 D-4	mTRAJ 45	CAASVNTGADR LTF	1(95)
	M2/BL/D15	mTRBV1	CASTNRGEVFF	mTRBJ 1-1	mTRAV1 3-2	mTRAJ 16		1(95)
EAE8 -CD8	M1/BL/D7	mTRBV2	CASRAGQGADT QYF	mTRBJ 2-5	mTRAV7 -5	mTRAJ 22	CAASSGSWQLIF	5(96)
EAE9 -CD8	M2/CNS/D15	mTRBV1	CASSDRGLGGYE QYF	mTRBJ 2-7	mTRAV1 3-4/DV7	mTRAJ 37	CAMAGKLIF	5(96)

Список пар CD8 TCR $\alpha\beta$, используемых для генерации репортерных клеточных линий и растворимых TCR. Мышь (M1, M2 и M3), кровь (BL) и день (D).

Таблица 4. Миелиновые пептиды, используемые для стимуляции клеточной линии EAE-CD8 TCR

Пептидный бассейн -1			Пептидный бассейн -2			Пептидный бассейн -3			Пептидный бассейн -4		
протеин	длина	последовательность									
PLP	8	AAATLVSL	PLP	10	AFPSKTSASI	MOG	9	CFLSLLLL	MOG	11	AAMELKVEDPF
PLP	8	AAFVGA	PLP	10	AFQYVIYGA	MOG	9	CSYAGQRFV	MOG	11	DPFYVWNPVGL
PLP	8	AATLVSL	PLP	10	AFVGAATLV	MOG	9	CYNWLHRRLL	MOG	11	FLSLLLLLQL
PLP	8	AATYNFAV	PLP	10	AHSLERVCHC	MOG	9	EVGWYRSPF	MOG	11	FSWSPCSL
PLP	8	ACSAVPVY	PLP	10	ALFCGCGHEA	MOG	9	FLSLLLLL	MOG	11	FVIVPVLGPL
PLP	8	ADARMYGV	PLP	10	ALLLAEGFYT	MOG	9	FSWSPCSLS	MOG	11	FYVWNPVGLTL
PLP	8	AEGFMTFH	PLP	10	ALTGTIEKLE	MOG	9	FYVWNPVGL	MOG	11	IRALVGDAAEL
PLP	8	AEGFYTTG	PLP	10	ALTVVWLLVF	MOG	9	GVLTLALV	MOG	12	IICYNWLHRRLL
PLP	8	APFKVCG	PLP	10	APFASLVATG	MOG	9	HSYQEEAAM	MOG	12	LICYNWLHRRLL
PLP	8	AFPSKTS	PLP	10	ARCLVGA	MOG	9	LALVPTLL	MOG	12	LVLFLQHLRLL
PLP	8	AFQYVIY	PLP	10	ARMYGVLPWN	MOG	9	ITLIVVIVP	MOG	12	SFSWSPCSL
PLP	8	AFVGAAT	PLP	11	AAATLVSLTIF	MOG	9	IVPVLGPLV	MOG	12	SWSPCSL
PLP	8	AHSLERV	PLP	11	AAFVGAATLV	MOG	9	LAGQLEEL	MOG	12	VGLVFLQHLRLL
PLP	8	ALFCGCGH	PLP	11	AATLVSLTIFM	MOG	9	LQHLRGLK	MOG	12	WSFWSWSPCSL
PLP	8	ALLLAEGF	PLP	11	AATYNFAVLK	MOG	9	PTILLQPVV	MOG	12	GQFRVIGPGYPI
PLP	8	ALTGTIEK	PLP	11	ACSAVPVYIYF	MOG	9	QVPVGLVFL	MOG	12	HRRLAGQLEEL
PLP	8	ALTVVWLL	PLP	11	ADARMYGVLPW	MOG	9	RVIGPGYPI	MOG	12	ILLQVPGVFL
PLP	8	APFASLV	PLP	11	AEGFMTFHLFI	MOG	9	RVPCWKITL	MOG	12	LVALIICYNWLH
PLP	8	ARCLVGA	PLP	11	AEGFYTTGAVR	MOG	9	SCFLSLLL	MOG	12	PFYVWNPVGLTL
PLP	8	ARMYGVLP	PLP	11	APFGKVCNSL	MOG	9	SLLLLLQL	MOG	12	PLVALIICYNWL
PLP	9	AAATLVSL	PLP	11	AFPSKTSASIG	MOG	10	CFLSLLLLL	MOG	12	SFSWSPCSL
PLP	9	AAFVGAAT	PLP	11	AFQYVIYGTAS	MOG	10	CSYAGQRFVI	MOG	12	TLFVIVPVLGPL
PLP	9	AATLVSLT	PLP	11	AFVGAATLV	MOG	10	CYNWLHRRLL	MOG	12	VALIICYNWLHR
PLP	9	AATYNFAV	PLP	11	AHSLERVCHCL	MOG	10	FRVIGPGYPI	MOG	12	VGLVFLQHLRLL
PLP	9	ACSAVPVY	PLP	11	ALFCGCGHEAL	MOG	10	FSWSPCSLS	MOG	12	WSFWSWSPCSL
PLP	9	ADARMYGV	PLP	11	ALLLAEGFYTT	MOG	10	FVIVPVLGPL	MOG	12	FRDHSYQEEAAM

PLP	9	AEFQMTFHL	PLP	11	ALTGTEKLIET	MOG	10	GLVFLFLQHR	MBP	8	VVHFFKNI
PLP	9	AEGFYTTGA	PLP	11	APFASLVATGL	MOG	10	IALVPTILLQ	MBP	8	RTTHYGSL
PLP	9	AFPGKVCGS	PLP	11	ARCLVGAPFAS	MOG	10	ICYNWLHRRLL	MBP	8	IGRFFSGD
PLP	9	AFPSKTSAS	PLP	11	ARMYGLVPWNA	MOG	10	IGPGYPICAL	MBP	8	SIGRFFSG
PLP	9	AFVGAATL	PLP	11	ASFFFLYGALL	MOG	10	ISPGKNATGM	MBP	8	LIRLFSRD
PLP	9	AHSLERVCH	PLP	11	ASIGSLCADAR	MOG	10	ITLFLVIVPL	MBP	8	VHFFKNIV
PLP	9	ALFCGCGHE	PLP	11	ASLVATGLCFE	MOG	10	LAGQFLEELR	MBP	8	TSAEDTAV
PLP	9	ALLLAEGFY	MOG35-55		MEVGYWRSPFS	MOG	10	LQVPVGLVFL	MBP	8	SKYLATAS
					RVVHLYRNGK						
PLP	9	ALTGTEKLI	MOG37-4		VGWYRSPFSR	MOG	10	L.SLLLLLQJL	MBP	8	RSKYLATA
PLP	9	ALTVVWLLV	MOG44-54		FSRVVHLYRNG	MOG	10	LTLIALVPTI	MBP	8	VFGADAI
PLP	9	APFASLVAT	PLP	12	AATYNFAVLKLM	MOG	10	L.VFLFLQHRL	MBP	8	YLATASTM
PLP	9	ARCLVGAPF	PLP	12	AATYNFAVLKLM	MOG	10	PFYVWVNPVGL	MBP	8	FFKNIVTP
PLP	9	ARMYGLVLPW	PLP	12	AEFQMTFHLFIA	MOG	10	PSCFLSLLL	MBP	8	ASGGLDVM
PLP	9	ASFFLYGA	MOG	8	CFLSLLL	MOG	10	RAEVENLHRT	MBP	8	IQNNGTSA
PLP	9	ASIGSLCAD	MOG	8	FLFLQHRL	MOG	11	FSWPSCLSL	MBP	8	VVHFFKNI
PLP	1	AAATLVSLLT0	MOG	8	FSWPSCL	MOG	11	GLVFLFLQHRL	MBP	8	AIQNNGTS
PLP	1	AAFVGAAT0L	MOG	8	FYVWVNPV	MOG	11	ICYNWLHRRLLA	MBP	8	DSRSGSPM
PLP	1	AAATLVSLT0F	MOG	8	GVLTLIAL	MOG	11	IICYNWLHRRLL	MBP	8	DAIQNGGT
PLP	1	AATYNFAV0K	MOG	8	IALVPTIL	MOG	11	L.VFLFLQHRLR	MBP	8	TQDENPVV
PLP	1	ACSAVPVYI0	MOG	8	ICYNWLHR	MOG	11	SWPSCLSL	MBP	8	NWQGAHPA
PLP	1	ADARMYGV0P	MOG	8	ISEGKVTL	MOG	11	VGWYRSPFSRV	MBP	9	VVHFFKNIV
PLP	1	AEFQMTFHL0F	MOG	8	IVPVLGPL	MOG	12	EVGWYRSPFSRV	MBP	9	PVVHFFKNI
PLP	1	AEGFYTTGA0V	MOG	8	KITLFVIV	MOG	12	FSWPSCLSL	MBP	9	GNRPHLRL
PLP	1	AFPGKVCGSN0	MOG	9	ALIICYNWL	MOG	12	GLVFLFLQHRLR	MBP	9	SIGRFFSGD
Peptide Pool-5			Peptide Pool-6			Peptide Pool-7					
Protein	Length	Sequence	Protein	Length	Sequence	Protein	Length	Sequence	Protein	Length	Sequence
MBP	9	TRTHYGSL	MBP	11	EADAIQNNGTS	MAG	9	AIVCYITQT			
MBP	9	SQRSKYLAT	MBP	11	PTAASGGLDVM	MAG	9	AKIGPVGAV			
MBP	9	VMASQKRPS	MBP	11	TQDENPVVHFF	MAG	9	AKSLYLDLE			
MBP	9	VHFFKNIVT	MBP	11	DAIQNNGTSAE	MAG	10	AAARDTVQCL			
MBP	9	SKYLATAST	MBP	11	VVHFFKNIVTP	MAG	10	AAPPNTTLQF			
MBP	9	MDHARHGFL	MBP	11	STMDHARHGFL	MAG	10	AARDTVQCLC			
MBP	9	AASGGLDVM	MBP	12	ENPVVHFFKNIV	MAG	10	ACLAENAYGQ			
MBP	9	DAIQNNGTS	MBP	12	ASTMDHARHGFL	MAG	10	ADSNPPLLT			
MBP	9	KYLATASTM	MBP	12	ADPGNRPHLRL	MAG	10	AENAYGQDNR			
MBP	9	ADPGNRPHL	MBP	12	SIGRFFSGDRGA	MAG	10	AENYQQRAT			
MBP	9	NNWQGAHPA	MBP	12	DSHTRTHYGSL	MAG	10	AFALLIIVC			
MBP	9	AIQNNGTSA	MBP	12	SQHGRITQDENPV	MAG	10	AFEGTCVSI			
MBP	9	FLPRHRDTG	MBP	12	AHPADPGNRPHL	MAG	10	AFELPSRNV			
MBP	9	VVHFFKNIV	MAG	8	AAARDTVQ	MAG	10	AFNLSVEFAP			
MBP	9	HFFKNIVTP	MAG	8	AAPPNTTL	MAG	10	AFPNTLQFE			
MBP	9	TASEDSDFV	MAG	8	AARDTVQC	MAG	10	AGTEVEVSCM			
MBP	10	SKYLATASTM	MAG	8	ACLAENAY	MAG	10	AHRLMWAKIG			
MBP	10	TMDHARHGFL	MAG	8	ADSNPPPL	MAG	10	AIEGSHVSL			
MBP	10	STMDHARHGFL	MAG	8	AENAYGQD	MAG	10	AILIAIVCYI			
MBP	10	PVVHFFKNIV	MAG	8	AENYQQR	MAG	10	AIVCYITQTR			
MBP	10	VHFFKNIVTP	MAG	8	AEYAEIRV	MAG	10	AKIGPVGAVV			
MBP	10	SDVFGADAI	MAG	8	AFAILIAI	MAG	10	AKSLYLDLEE			
MBP	10	HTRTHYGSL	MAG	8	AFEGTCVS	MAG	10	ANGHRLGCQA			
MBP	10	VVHFFKNIVT	MAG	8	AFELPSRN	MAG	11	AAARDTVQCLC			
MBP	10	GNRPHLRLF	MAG	8	AFNLSVEF	MAG	11	AAPPNTLQFE			
MBP	10	SIGRFFSGDR	MAG	8	AFPNTLQ	MAG	11	AARDTVQCLCV			
MBP	10	DAIQNNGTSA	MAG	8	AGTEVEVS	MAG	11	ACLAENAYGQD			
MBP	10	FLPRHRDTG	MAG	8	AHRLMWAK	MAG	11	ADSNPPPLTW			
MBP	10	ADAIQNNGTS	MAG	8	AIEGSHVS	MAG	11	AENAYGQDNRT			
MBP	10	TAASGGLDVM	MAG	8	AILIAIVC	MAG	11	AENYQQRATA			
MBP	10	SKYLATASTM	MAG	8	AIVCYITQ	MAG	11	AFALLIAIVCY			
MBP	10	TMDHARHGFL	MAG	8	AKIGPVGA	MAG	11	AFEGTCVSI			
MBP	10	TAVTDSKHTA	MAG	8	AKSLYLDL	MAG	11	AFELPSRNVTV			
MBP	10	PADPGNRPHL	MAG	9	AAARDTVQC	MAG	11	AFNLSVEFAP			
MBP	10	VHFFKNIVTP	MAG	9	AAPPNTLQ	MAG	11	AFPNTLQFEG			
MBP	10	ADPGNRPHL	MAG	9	AARDTVQCL	MAG	11	AGTEVEVSCMV			
MBP	11	NPVVHFFKNIV	MAG	9	ACLAENAYG	MAG	11	AHRLMWAKIGP			
MBP	11	PVVHFFKNIVT	MAG	9	ADSNPPLL	MAG	11	AIEGSHVSLC			
MBP	11	SIGRFFSGDRG	MAG	9	AENAYGQDN	MAG	11	AILIAIVCYIT			
MBP	11	VHFFKNIVTPR	MAG	9	AENYQQR	MAG	11	AIVCYITQTRR			
MBP	11	STMDHARHGFL	MAG	9	AEYAEIRVK	MAG	11	AKIGPVGAVVA			
MBP	11	SHTRTHYGSL	MAG	9	AFAILIAIV	MAG	11	AKSLYLDLEE			
MBP	11	DSIGRFFSGDR	MAG	9	AFEGTCVSI	MAG	11	ANGHRLGCQAA			
MBP	11	SKYLATASTM	MAG	9	AFELPSRNV	MAG	12	EDGVYACLAENA			
MBP	11	TMDHARHGFL	MAG	9	AFNLSVEFA	MAG	12	EELAEYAEIRVK			
MBP	11	VVHFFKNIVTP	MAG	9	AFPNTLQF	MAG	12	EEVTPGEDGVYA			
MBP	11	RSKYLATASTM	MAG	9	AGTEVEVSC	MAG	12	EFAPILLLESHC			
MBP	11	FLPRHRDTGIL	MAG	9	AHRLMWAKI	MAG	12	EFRISGAPDKYE			
MBP	11	ADAIQNNGTSA	MAG	9	AIEGSHVSL	MAG	12	EFVYSERSGLL			
MBP	11	GFLPRHRDTGI	MAG	9	AILIAIVCY	MAG	12	EGETVSLCSTQ			

Список из 350 пептидов, полученных из гликопротеина миелина олигодендроцитов (MOG), протео-

липидного белка (PLP), основного белка миелина (MBP), миелина ассоциированного гликопротеина (MAG). Эти пептиды миксируются в 7 пептидных пулов (PP1-7) и используются для стимуляции клеточной линии TCR.

Таблица 5. Показания глубокого секвенирования дрожжей H2-Db за раунд и обогащение

Иммунизация	Заболеемость α	Сумма	Уникальн	Частица	Исправленная Складка
		Последовательности	Пептиды	Уникальн пептиды/RD	обогащение/RD
EAE7-CD8 TCR					
Naïve		730261	423290	0.579642073	1
RD1		339453	148333	0.436976548	1.326483255
RD2		344611	17238	0.050021619	11.58783121
RD3		383700	557	0.001451655	399.297421
RD4		317153	29	9.14385E-05	6339.145601
EAE6-CD8 TCR					
Naïve		435087	201808	0.46383367	1
RD1		110427	70893	0.641989731	0.722493909
RD2		65165	21848	0.335272002	1.383454829
RD3		81996	87	0.001061027	437.1552369
RD4		60005	48	0.000799933	579.8404036
6218-CD8 TCR					
Naïve		435087	201808	0.46383367	1
RD1		64312	48978	0.761568603	0.60905041
RD2		322526	59975	0.185954001	2.494346282
RD3		336894	293	0.00086971	533.3200698
RD4		336315	144	0.00042817	1083.2932

Обогащение уникальными пептидами за раунд (RD) для 6218, EAE6 и EAE7-CD8 TCR выборки H2-Db библиотеки.

Сводка общего количества считываний Illumina по раундам для 6218, EAE6 и EAE7-CD8 TCR выборок. Уникальные пептидные последовательности соответствовали считываниям, которые были в кадре без стоп-кодона. Доля уникальных пептидов относится к общему количеству считываний секвенирования на RD, деленному на уникальные пептидные последовательности для этого RD. Скорректированное обогащение пищи относится к обогащению пищи пептидами на выбор RD, нормализованному к общему числу считываний из наивного RD.

Таблица 6. Клинические признаки EAE, связанные с иммунизацией MOG, MOG + SP, SP

	MOG ₃₅₋₅₅	10/10 (100)	46.3 ± 5.9	16.3 ± 0.7	3 ± 0.4	3.2 ± 0.4	13.8 ± 0.2
	MOG ₃₅₋₅₅ + SP	3/10 (30)	8.5 ± 4.8	4.7 ± 2.4	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.4	15 ± 0.1
Pathways upregulated in Ly49⁺ cell							
Overall $\chi^2 =$		$P < 0.0001$	$P = 0.0006$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P = 0.0082$	
		21.45, 2,					
		$P < 0.0001$					

Таблица 7. Клинические черты EAE, связанные с MOG, SP проблема и MOG проблема

Immunization	Incidence ^a	CDS	DA	SI	PS	DO
MOG ₃₅₋₅₅	10/10, 100	55.8 ± 3.9	17 ± 0.3	3.14 ± 0.2	4 ± 0.1	13.3 ± 0.3
SP challenge	6/10, 60	43.3 ± 6.8	9 ± 2.5	1.67 ± 0.5	2.1 ± 0.6	8.7 ± 2.5
MOG challenge	6/10, 60	43.3 ± 5.3	8.2 ± 2.5	1.29 ± 0.3	1.5 ± 0.4	10 ± 2.8
Overall $\chi^2 =$		MOG ₃₅₋₅₅ > PPT	MOG ₃₅₋₅₅ > PPT	MOG ₃₅₋₅₅ > PPT	MOG ₃₅₋₅₅ > PPT	NS
		>PPT	Challenge >	Challenge	Challenge >	$P = 0.5333$
		Challenge	MOG ₃₅₋₅₅ > MOG ₃₅₋₅₅	>MOG ₃₅₋₅₅	MOG ₃₅₋₅₅	
		>MOG ₃₅₋₅₅	Challenge	Challenge	Challenge	
		Challenge	$P = 0.0055$	$P = 0.0052$	$P = 0.0054$	
		Challenge	$P = 0.0004$			

CDS, кумулятивный показатель заболевания в течение 30 дней эксперимента; DA, затронутые дни; SI, индекс тяжести (кумулятивный показатель заболевания/затронутые дни); SP, суррогатные пептиды; PS, пиковый балл; DO, день начала у пораженных животных; NS, незначительный. Значения показаны как средства ± SEM. Значимость различий для значений признаков среди экспериментальных условий оценивалась с помощью I₂ анализа (общая заболеваемость) или анализа One-ANOVA, за которым следовали пост-специальные множественные сравнения Туки; Значения P указаны в соответствии с указаниями. Полученный процент. Животные считались пострадавшими, если клинические баллы ≥Σ1 были очевидны в течение ≥Σ2 дней подряд.

Таблица 8. Дифференциально экспрессированные гены между клетками Ly49+ и Ly49-CD8+, отсортированные на основе геной онтологии

T cell activation	И18r1, Nck2, Cd28, Bcl2, Lax1, Ptprc, Xcl1, Fcer1g, Psen2, Stx11, Myb, Fyn, Adora2a, Ifng, Ncor1, Ccl5, Tbx21, Adam17, Sos2, Zbtb1, Ctla2a, F2r1, Zmiz1, Lgals3, Il7r, Nlrc3, Prkdc, Tfrc, Tigit, Btla, Cblb, Runx2, Tnfsf14, Zfp3612, Malt1, Ptpn2, Soc6, Gata3, Il2ra, Rc3h2, Cd44, Rasgrp1, Zbtb7b, Ptpn22, Chd7, Wwp1, Clec2i, Nfkbid, Itgal, Itga d, Adam8, 5830411N06Rik, Casp3, Il12rb1, Smad3, Rab27a, Eomes, Ccr2
Миграция лейкоцитов	Xcl1, Fcer1g, Ifng, Ccl5, Ccl4, Epx, Tbx21, Itgb3, Prkca, Adam17, Pik3cg, Lyst, F2r1, Itga2, Lgals3, Pdgb, Gpr15, Tnfsf14, Rock1, Camk1d, Gata3, Ptpn22, Lyn, Padi2, Swap70, Adam8, Itgb1, Cxcr5, Dapk2, Adam10, Cx3cr1, Ccr2, Cxcr3
Дифференцировка клеток	И18r1, Cd28, Bcl2, Ptprc, Fcer1g, Myb, Ifng, Ncor1, Tbx21, Adam17, Sos2, Zbtb1, Ctla2a, Zmiz1, Il7r, Prkdc, Runx2, Zfp3612, Ptpn2, Gata3, Il2ra, Rc3h2, Cd44, Rasgrp1, Zbtb7b, Ptpn22, Chd7, Wwp1, Nfkbid, Adam8, 5830411N06Rik, Eomes, Ccr2
Хемотаксис Т-клеток	Xcl1, Ccl5, Adam17, Pik3cg, Tnfsf14, Adam10, Ccr2, Cxcr3
Негативная регуляция процесса иммунной системы	Inpp5d, Traf3ip1, Lax1, Ptprc, Xcl1, Fcgr2b, Fcer1g, Adora2a, Ifng, Tbx21, Id2, Serpinb9, F2r1, Pik3r1, Lgals3, Il7r, Nlrc3, Prkdc, Tigit, Btla, Cblb, Samsn1, Pdpk1, Ptpn2, Soc6, Tjp2, Pik3ap1, Il2ra, Cd44, Zbtb7b, Pias3, Ptpn22, Fam19a3, Lyn, Smpd3b, Padi2, Pilrb1, Nod1, Clec2i, Klre1, Pglyrp1, Nfkbid, Casp3, Oryd4, Zfp1, Ubash3b, Ccr2
Дифференцировка лимфоцитов	И18r1, Cd28, Dock10, Inpp5d, Bcl2, Ptprc, Fcer1g, Myb, Ifng, Ncor1, Tbx21, Ikzf3, Adam17, Id2, Hectd1, Sos2, Zbtb1, Ctla2a, Pik3r1, Zmiz1, Il7r, Ep300, Prkdc, Runx2, Zfp3612, Malt1, Ptpn2, Hhex, Hells, Gata3, Il2ra, Il15ra, Rc3h2, Cd44, Rasgrp1, Zbtb7b, Ptpn22, Chd7, Wwp1, Pglyrp1, Nfkbid, Adam8, 5830411N06Rik, Eomes, Ccr2, Itm2a
Регуляция дифференцировки лейкоцитов	Cd28, Inpp5d, Ptprc, Myb, Ifng, Ccl5, Tbx21, Ikzf3, Itgb3, Prkca, Asxl2, Id2, Sos2, Zbtb1, Fos, Ctla2a, Pik3r1, Zmiz1, Il7r, Zfp3612, Ptpn2, Tjp2, Gata3, Il2ra, Il15ra, Cd44, Rasgrp1, Zbtb7b, Pias3, Lyn, Pilrb1, Clec2i, Pglyrp1, Nfkbid, Adam8, Zfp1, Ubash3b, Ccr2
Регуляция активации клеток	Nck2, Cd28, Lax1, Ptprc, Xcl1, Myb, Adora2a, Ifng, Ccl5, Tbx21, Sos2, Zbtb1, Ctla2a, Zmiz1, Lgals3, Il7r, Tfrc, Tigit, Btla, Cblb, Tnfsf14, Malt1, Ptpn2, Soc6, Gata3, Il2ra, Cd44, Rasgrp1, Zbtb7b, Ptpn22, Clec2i, Nfkbid, Itgal, Adam8, Casp3, Il12rb1, Ccr2
Пути, регулируемые в Ly49+ cell	
Активация Т-клеток	Slamf1, Dusp10, Ccl2, Ccr7, Sox4, Gadd45g, H2-Oa, H2-DMa, Gsn, Rorc, Tnfai812, Sit1, Ddost, Rho h, Dtx1, Ephb6, Cd8a, Bcl3, Rps3, Lat, Coro1a, Psmb10, Ccr9
Миграция лейкоцитов	Slamf1, Ccl2, Ccr7, Itgb7, Rps19, Rpl13a, Coro1a
Дифференциация клеток	Д-Дusp10, Ccr7, Sox4, Gadd45g, H2-Oa, H2-DMa, Rorc, Rhoh, Dtx1, Cd8a, Bcl3, Ccr9
Хемотаксис Т-клеток	Ccr7
Негативная регуляция процесса иммунной системы	Slamf1, Dusp10, Gpr68, Hist1h4d, Hist1h4c, H2-Oa, Tap1, Nfkbil1, Tnfai812, Dtx1, Hist4h4, Nlrp4c, Rps19, Inpp4b, Ldlr, Tsc22d3
Дифференцировка лимфоцитов	Slamf1, Dusp10, Ccr7, Hdac5, Sox4, Gadd45g, Ly6d, Nfam1, H2-Oa, H2-DMa, Rorc, Rhoh, Dtx1, Cd8a, Bcl3, Cntm7, Ccr9
Регуляция дифференцировки лейкоцитов	Dusp10, Ccr7, Gpr68, Nfam1, H2-Oa, H2-DMa, Car2, Hax1, Rorc, Tesc, Dtx1, Inpp4b
Регуляция активации клеток	Т-Сlamf1, Dusp10, Ccl2, Ccr7, H2-Oa, H2-DMa, Gsn, Rorc, Tnfai812, Sit1, Dtx1, Ephb6, Rps3, Lat, Coro1a

Таблица 9. Демографические и клинические особенности набора данных рассеянного склероза

Пациент ID	Пол (F - ж, M - м)	Этническая принадлежность/ Происхождение	Возраст на экзамене	Подтип MS на экзамене
MS1	F	1	23	CIS
MS2	F	1	32	RR
MS3	F	1	22	Unknown
MS4	F	1,4	40	RR
MS5	F	1	38	RR
MS6	F	1	47	RR
MS7	F	1	24	CIS
MS8	F	1	26	CIS
MS9	M	3	33	RR
MS10	F	1	40	RR
MS11	F	3	31	CIS
MS12	F	1	25	RR
MS13	M	2	43	Unknown
MS14	F	2	31	RR
MS15	F	1	43	CIS
MS16	F	1	36	RR
MS17	F	1	38	RR
MS18	F	1	38	RR

Идентификатор	Пол (F - ж, M - м)	Этнос	Возраст при взятии крови
HC			
HC1	F	3	26
HC2	F	3	30
HC3	F	3	32
HC4	F	3	23
HC5	M	4	28
HC6	F	4	35
HV7	F	4	36
HC8	M	4	40
HC9	F	2	28
HC10	F	2	47

Участники исследования формируют продолжающееся проспективное обсервационное исследование в Калифорнийском университете, Сан-Франциско, Центр рассеянного склероза Калифорнии. Пациенты подбирались при подозрении на наличие РС или с первоначальными признаками, указывающими на РС, в течение 24 ч и не позднее 90 дней. Пациенты с клинически изолированными синдромами (CIS) также были включены, если они соответствовали критериям магнитно-резонансной томографии при рассеянном склерозе (MAGNIMS) (Polman et al., 2011). Критерии приемлемости также включали отсутствие предварительного лечения модифицирующей болезнью РС терапии или иммунных супрессантов бордового спектра и отсутствие лечения кортикостероидами в течение последних 30 дней. Лимфоциты периферической крови получали фиколл-градиентом и замораживали в жидком азоте в течение 2 ч флеботомии. Соответствующие возрасту и полу здоровые контрольные РВМС были получены из Стэнфордского центра крови, Стэнфордского университета, Стэнфорда, Калифорния. 1-европеец американский, 2-афроамериканец, 3-латиноамериканец, 4-азиат. HLA-DRB1*15:01; 1-носитель и 2-несущий. ПП первично-прогрессирующий РС, ОР рецидивирующий ремиттирующий РС, СНГ клинически изолированный синдром. HC, здоровый контроль.

Публикации по теме

Международный консорциум генетики рассеянного склероза и др. Генетический риск и основная роль клеточно-опосредованных иммунных механизмов при рассеянном склерозе. Природа 476, 214-219 (2011).

Фалланг, Л.-Е. и др. Нат. 10, 1096-1101 (2009).

Соллид и др. Иммуногенетика 64, 455-460 (2012).

Замвил С. и др. Природа 317, 355-358 (1985).

Blankenhorn E. P. et al. Ann. Neurol. 70, 887-896 (2011).

Skulina C. et al. PNAS 101, 2428-2433 (2004).

- Babbe H. et al. *J. Exp. Med.* 192, 393-404 (2000).
- Blink S. E. & Miller S. D. *Cytop.* 9, 15-22 (2009).
- Han A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 110, 13073-13078 (2013).
- Бирнбаум М.Е. и др. *Ячейка* 157, 1073-1087 (2014).
- Джи М. Х. и др. *Ячейка* 172, 549-556.e16 (2018).
- He et al. *Nat. Биотехнол.* 32, 684-692 (2014).
- Вэй Ю.-Л. et al. *Front Immunol* 6, 118 (2015).
- Langrish C. L. and al. *J. Exp. Med.* 201, 233-240 (2005).
- Кронке и др. 205, 1535-1541 (2008) мед.
- Ben Nun et al. *European Journal of Immunology* 11, 195-199 (1981).
- Ягер и др. *Журнал иммунологии* 183, 7169-7177 (2009).
- Дентон А. Е. и др. *Журнал иммунологии* 187, 5733-5744 (2011).
- Day E.B. et al. *PNAS* 108, 9536-9541 (2011).
- Мун Д. Дж. *Иммунитет* 27, 203-213 (2007).
- Ким Х.-Дж. и Кантор Х. Семин. *Иммунол.* 23, 446-452 (2011).
- Lu, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 105, 19420-19425 (2008).
- Ким Х.-Дж. и др. *Проц. Натл. Акад. США* 108, 2010-2015 (2011).
- Agarwal R. K. & Caspi, R. R. *Methods Mol. Med.* 102, 395-419 (2004).
- Zemmour D. et al. *Nat. Immunol.* 19, 291-301 (2018).
- Hvas et al. *J. Neuroimmunol.* 46, 225-234 (1993).
- Wucherpfennig K. W. et al. *PNAS* 89, 4588-4592 (1992).
- Gandhi R., Laroni, A. & Weiner, H. L. *J. Neuroimmunol.* 221, 7-14 (2010).
- Каккамо Н. и др. *Кровь* 118, 129-138(2011).
- Moens, E. and al. *J. Leukoc. Биол.* 89, 743-752 (2011).
- Саттон К. Э. и др. *Иммунитет* 31, 331-341 (2009).
- Price et al. *PLoS ONE* 7, e39750 (2012).
- Harrington L. E. et al. *Nat. Immunol.* 6, 1123-1132 (2005).
- Elias et al. *Int Immunol* 11, 957-966 (1999).
- Kumar et al. *J. Exp. Med.* 184, 1609-1617 (1996).
- Hu D. et al. *Nat. Immunol.* 5, 516-523 (2004).
- Пануцакопулу В. и др. *Дж. Вкладывать.* 113, 1218-1224 (2004).
- Davis & Brodin *Rebooting Human Immunology.* Ежегодный обзор иммунологии 36, 843-864 (2018).
- O'Shea, et al. *Current Biology* 3, 658-667 (1993).
- Бирнбаум М.Е. и др. *Ячейка* 157, 1073-1087 (2014).
- Адаме Д. Дж. *Иммунитет* 35, 681-693 (2011).
- Нельсон Р. В. и др. *Иммунитет* 42, 95-107 (2015).
- Stadinski B. D. et al. *PNAS* 107, 10978-10983 (2010).
- Альтман Дж.Д. и др. *Наука* 274, 94-96 (1996).
- Grotenbreg G.M. et al. *PNAS* 105, 3831-3836 (2008).
- Krementsov D. N. et al. *Ann. Neurol.* 75, 50-66 (2014).
- Теннакун Д. К. и др. *Дж.* 176, 7119-7129 (2006).
- Bian Y. et al. *PLOS Pathogens* 13, e1006384 (2017).
- Mahajan et al. *J Vis Exp* e3184-e3184 (2011). doi:10.3791/3184
- Мамедов М. Р. и др. *Иммунитет* 48, 350-363.e7 (2018).
- Love M. I., Huber, W. & Anders, S. *Genome Biol.* 15, 31 (2014).
- Li B. & Dewey C. N. *BMC Bioinformatics* 12, 323 (2011).
- Kolde R. R пакет версии 1.0. 8. (2015).
- Ю.Г. кластер Профильник: Универсальный инструмент обогащения для функционального и сравнительного изучения. doi:10.1101/256784

Пример 2. CD8⁺KIR⁺ клетки в болезнях человека

Небольшое подмножество CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих белки Ly49 у мышей, может подавлять аутоиммунитет в модели демиелинизирующего заболевания. В настоящем описании показано, что существует заметно повышенная частота CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих иммуноглобулин-киллерные клетки, подобные рецепторам (KIR), функциональным аналогам семейства Ly49, в крови и воспаленных тканях у пациентов с широким спектром аутоиммунных заболеваний. При целиакии (CeD) мы показываем, что KIR⁺, но не KIR-CD8⁺ Т-клетки способны устранять патогенные глиадин-специфические CD4⁺ Т-клетки из лейкоцитов пациентов искусственно. Вместе с данными экспрессии генов это показывает, что эти клетки являются вероятным эквивалентом мышинных Ly49⁺ CD8⁺ Т-клеток. Кроме того, у пациентов с COVID-19, которые могут страдать от серьезных клинических проблем, которые наводят на мысль об аутоиммунитете, мы обнаруживаем, что повышенные уровни Т-клеток KIR⁺ CD8⁺ коррелируют с тяжестью заболевания и началом васкулита, распространенного осложнения COVID-19, тогда как регуляторные Т-клетки CD4⁺ не показывают этой тенденции. Кроме того, мы также обнаружили увеличение CD4⁺

Т-клеток с фенотипами, уникальными для глиадин-специфических клеток в CeD, которые также повышены при некоторых аутоиммунных заболеваниях. Эти результаты определяют и характеризуют регуляторное подмножество CD8+ Т-клеток у людей, которое, как мы предполагаем, является общей чертой реакций на инфекционные заболевания, а также аутоиммунитета, и которое функционирует для контроля самореактивных или иным образом патогенных Т-клеток. Эти данные также свидетельствуют о том, что многие осложнения COVID-19 являются результатом различных типов аутоиммунитета.

В то время как большинство CD8+ Т-клеток ориентированы на контроль инфицированных патогеном или раковых клеток, у мышей уже давно есть доказательства того, что некоторые из них также могут подавлять аутоиммунный ответ. Эта потенциально регуляторная функция CD8+ Т-клеток была впервые связана с истощением CD8+ Т-клеток в экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ), мышинной модели рассеянного склероза человека (РС). Ингибирующее семейство рецепторов С-типа, Ly49, которые повсеместно распространены на клетках естественных киллеров (NK), были идентифицированы как уникальные поверхностные маркеры для этого регуляторного подмножества CD8+ Т-клеток, а транскрипционный фактор Helios как важный контрольный элемент для их дифференцировки и функции у мышей. Недавно мы показали, что клонально расширенные CD8+ Т-клетки в ЕАЕ распознают пептиды, связанные с H2-Db, и что эти пептиды стимулируют регуляторные Т-клетки Ly49 + CD8+ и подавляют заболевание. Это расширяет первоначальные наблюдения за пределы Qa-1, чтобы охватить классические взаимодействия МНС класса I, показывая общий механизм периферической толерантности. Здесь мы идентифицируем CD8+ Т-клетки, экспрессирующие иммуноглобулин-киллер-клетки, подобные рецепторам (KIR), функциональный аналог мышинового семейства Ly49 у людей, как новое подмножество CD8+ Т-клеток, которое нацелено на патогенные CD4+ Т-клетки при целиакии (CeD) и других аутоиммунных расстройствах и инфекционных заболеваниях.

Повышение KIR+CD8+ Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях человека

Как мышинные рецепторы Ly49, так и рецепторы KIR человека связываются с молекулами МНС класса I, обычно имеющими ингибирующие мотивы ингибирования на основе тирозина (ITIM) в их цитоплазматических хвостах и повсеместно экспрессируются на NK-клетках, а также на небольшом подмножестве (1 ~ 5%) CD8+ Т-клеток. Мы проанализировали CD8+ Т-клетки, экспрессирующие ингибирующие KIRs в периферической крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями и здоровыми контрольными группами, соответствующими возрасту/полу (HC). В частности, мы обнаружили, что KIR3DL1 и KIR2DL3 являются двумя основными подтипами KIR, экспрессируемыми небольшим подмножеством человеческих CD8+ Т-клеток. Мы обнаружили, что KIR+CD8+ Т-клетки были значительно увеличены, в десять раз, у подгруппы пациентов с РС и системной красной волчанкой (СКВ) и в меньшей степени при CeD по сравнению со здоровыми контрольными группами (фиг. 17a). Кроме того, частота KIR+CD8+ Т-клеток в крови пациентов с СКВ положительно коррелировала с частотой потенциально аутореактивных CD4+ Т-клеток с фенотипами, ранее обнаруженными как уникальные для глиадин-специфических CD4+ Т-клеток в CeD (CD45RA-CD62L-PD-1 + CXCR3 + CD39 + CD38 + CD127-CD25lowCD161 + ICOS +) (фиг. 17b), что указывает на синхронное расширение KIR + CD8 + Т-клеток с интенсивностью аутоиммунных реакций CD4+ Т-клеток. Далее мы исследовали, присутствуют ли также KIR+CD8+ Т-клетки в воспаленных тканях аутоиммунных заболеваний. Мы воспользовались общедоступными одноклеточными данными RNA-seq из почек СКВ и синовии ревматоидного артрита (РА), ранее сгенерированными программой Accelerating Medicines Partnership RA/SLE. Во-первых, мы идентифицировали CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют транскрипты KIR (KIR3DL1, KIR2DL3 и KIR2DL2) в почках и синовиях. В частности, заметно повышенное количество KIR+CD8+ Т-клеток наблюдалось в почках больных СКВ по сравнению со здоровыми почками (фиг. 17c). Кроме того, мы обнаружили более высокую частоту KIR+ CD8+ Т-клеток в синовиальных тканях пациентов с РА по сравнению с пациентами с остеоартритом (ОА), в то время как процент синовиальных клеток FOXP3 + CD4 + Treg был аналогичным между РА и ОА (фиг. 17d). Хотя и РА, и ОА вызывают воспаление суставов, РА является классическим аутоиммунным заболеванием, тогда как ОА таковым не является, предполагая, что KIR + CD8 + Т-клетки могут быть более важными в подавлении аутоиммунного воспаления, чем CD4 + Tregs.

KIR+CD8+ Т-клетки являются функциональным и фенотипическим эквивалентом мышинных Ly49+CD8+ Т-клеток. Затем мы попытались выяснить, являются ли Т-клетки KIR+CD8+ функциональным аналогом регуляторных CD8+ Т-клеток мыши Ly49+. Ранее мы обнаружили, что Ly49 + CD8 + Т-клетки подавляют миелин-олигодендроцитарные гликопротеиновые (MOG)-специфические CD4+ Т-клетки перфорин-зависимым образом, указывая на цитотоксичность как механизм подавления. Деамидированный глиадин, полученный из диетического глютена, является антигеном для CD4+ Т-клеток, которые управляют аутоиммунной энтеропатией в CeD человека. Поэтому мы исследовали, могут ли Т-клетки KIR+CD8+ подавлять глиадин-специфические CD4+ Т-клетки у пациентов с CeD. CD8+ Т-клетки очищали от мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs) пациентов с HLA-DQ2.5+ CeD; из этих KIR+CD8+ и KIR- CD8+ Т-клеток сортировали, активировали анти-CD3/CD28 микрошариками на ночь, а затем культивировали с CD8-обедненной фракцией PBMCs в соотношении 1:30 в присутствии 250 мкг/мл деамидированного глютена. Культуры были собраны на 6-й день, и глиадин-специфические CD4+ Т-клетки были обогащены и количественно определены с использованием меченых ПЭ тетрамеров

HLA-DQ2.5, смешанных с различными пептидами глиаина (фиг. 18a). В отсутствие KIR+CD8+ Т-клеток деамидированный глютен глубоко стимулировал расширение глиадин-специфических CD4+ Т-клеток. Важно отметить, что стимулированные Т-клетки KIR+CD8+ значительно уменьшали количество глиадин-специфических CD4+ Т-клеток, не влияя на общее количество CD4+ Т-клеток, тогда как KIR-CD8+ Т-клетки этого не делали (фиг. 18b). Мы также измерили привязку Приложения V на 3-й день (фиг. 18a), и обнаружили повышенное окрашивание глиадин-специфических CD4+ Т-клеток в присутствии KIR+CD8+ Т-клеток (фиг. 18c), указывая на то, что эти Т-клетки подавляют патогенные CD4+ Т-клетки путем прямого уничтожения. Этот эффект KIR + CD8 + Т-клеток нацелен только на небольшую часть CD4+ Т-клеток, поскольку они не оказали заметного влияния на пролиферацию CD4+ Т-клеток, реагирующих на стимуляцию анти-CD3.

Чтобы дополнительно исследовать, являются ли Т-клетки KIR+CD8+ фенотипическим эквивалентом мышинных Т-клеток Ly49+ у людей, был проведен анализ секвенирования РНК (RNA-seq) на KIR+ против KIR-CD8+ Т-клеток у пациентов с РС для сравнения с мышинными Ly49+ CD8+ Т-клетками в ЕАЕ (мышинная модель РС человека). Было 778 дифференциально экспрессированных генов (скорректированный $P < 0,05$, изменение складки > 2) между Т-клетками KIR+ и KIR-CD8+, среди них 300 были повышены и 478 были понижены в Т-клетках KIR + CD8 +. Примечательно, что KIR+CD8+ Т-клетки показали выраженную повышенную регуляцию цитотоксических молекул (например, GZMH, GZMB, PRF1 и GNLY), NK-ассоциированных генов (например, NKG7, NCR1 и семейства KLR) и молекул клеточного трафика (таких как CX3CR1, который опосредует миграцию лейкоцитов в воспаленные ткани и участвует в тканевом повреждении воспаления головного мозга и рецептора головного мозга ITGB1), в дополнение к ингибирующим генам рецептора KIR. Кроме того, Т-клетки KIR+CD8+ имели более высокие уровни транскриптов для гелиоса (кодируемого Irf2), транскрипционного фактора, связанного с регуляторными функциями как CD4+, так и CD8+ Т-клеток. С другой стороны, Т-клетки KIR+CD8+ понижают регулируемые наивные/запоминающиеся Т-клеточные молекулы, например CCR7, SELL, TCF7 и IL7R, что указывает на то, что они могли войти в программу дифференцировки эффекторных Т-клеток. Интересно, что Т-клетки KIR+CD8+ имели более низкую экспрессию костимулирующего рецептора CD28, что является одной из ключевых особенностей для регуляторных популяций CD8+ Т-клеток у мышей и людей. Анализ обогащения геной онтологии этих дифференциально экспрессированных генов показал обогащение для активации, пролиферации, миграции и дифференцировки Т-клеток. Кроме того, анализ обогащения набора генов (GSEA) показал, что около половины из 200 лучших генов, регулируемых в Ly49 + CD8 + Т-клетках (включая цитотоксическую молекулу GZMB, гены семейства KLRC, CX3CR1, ITGB1 и IKZF2), также были выше в KIR + CD8 + Т-клетках. Ранее мы обнаружили, что Ly49 + CD8 + Т-клетки экспрессировали 16 из 60 генов, сохраненных в регуляторных Т-клетках CD4 + (Tregs), и эти же гены сигнатуры Treg23 также были обогащены в KIR + CD8 + Т-клетках в анализе GSEA. В целом, анализ RNA-seq показывает, что KIR + CD8 + Т-клетки у пациентов с РС имеют много общего с Ly49 + CD8 + Т-клетками у мышей ЕАЕ.

Кроме того, мы также выполнили РНК-секвенирование на KIR+ и KIR-CD8+ Т-клетках от здоровых субъектов и пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями, в частности СeD и SLE, чтобы определить, есть ли общие черты, общие для клеток KIR + CD8 + В разных обстоятельствах. Мы идентифицировали набор из 963 генов, которые были дифференциально экспрессированы (скорректированный $P < 0,05$, изменение складки > 2) между Т-клетками KIR+ и KIR-CD8+ у всех субъектов, включая пациентов с НС, MS, СeD и SLE. Многие из них перекрывались с дифференциально экспрессированными генами, ранее определенными при РС. Однако более крупные складчатые изменения этих генов наблюдались у пациентов с более высокими частотами KIR+CD8+ Т-клеток. В соответствии с профилями транскриптов Т-клетки KIR+CD8+ имели более высокие уровни экспрессии белка для белков гранзима В, перфорина, CX3CR1, KLRG1, CD244, TIGIT, T-bet и Helios и более низкие уровни CCR7, CD27 и CD28, измеренные с помощью проточной цитометрии. Кроме того, мы сравнили KIR+ и KIR-CD8+ Т-клетки в почках или синовиальных для экспрессии тех же генов, обогащенных циркулирующими KIR+CD8+ Т-клетками. Подобно этим клеткам, как почечные, так и синовиальные KIR+CD8+ Т-клетки регулируются KLRG1, CD244, TIGIT, CX3CR1, PRF1, GZMB и IKZF2, одновременно понижая регуляцию CD28 и CCR7. В целом, наши результаты показывают, что Т-клетки KIR + CD8 + являются функциональным и фенотипическим эквивалентом мышинных Ly49 + CD8 + Т-клеток у людей, с сохраненными характеристиками как у здоровых субъектов, так и у людей с аутоиммунными заболеваниями.

Повышенные KIR+CD8+ Т-клетки коррелируют с иммунной дисрегуляцией у пациентов с COVID-19. Хотя ранее считалось, что большинство самоспецифических Т-клеток были устранены в тимусе, недавняя работа показывает, что это не так, и что многие такие клетки выживают и заселяют периферию как людей, так и мышей. Мы предположили, что это связано с тем, что постоянная угроза инфекционных заболеваний на протяжении всей истории человечества требует полного репертуара Т-клеток, так что даже самореактивные Т-клетки могут потребоваться в ответ на конкретный патоген. Этому согласуются классические эксперименты, показывающие, что инфекционные заболевания или методы лечения, которые их имитируют (например, полный адьювант Фройнда), могут активировать самоспецифические Т-

клетки. Существуют также анекдотические данные о том, что многие пациенты ссылаются на инфекцию, непосредственно предшествующую началу их заболевания. Таким образом, мы были заинтересованы в анализе пациентов с инфекционным заболеванием, чтобы увидеть, были ли KIR + CD8 + Т-клетки индуцированы как часть ответа.

В частности, появляющиеся сообщения показывают, что заражение коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) может привести к чрезмерной выработке провоспалительных цитокинов и появлению аутоиммунных осложнений, особенно у пациентов с более тяжелым заболеванием. Поэтому мы проанализировали частоту как KIR+CD8+ Т-клеток, так и аутоиммунных CD4+ Т-клеток с фенотипами, уникальными для глиадин-специфических клеток из CeD, в периферической крови пациентов с коронавирусной болезнью 2019 года (COVID-19) по сравнению со здоровыми субъектами, подобранными до пандемии. Подобно нашему предыдущему открытию у пациентов, инфицированных гриппом, частота аутоиммунных CD4+ Т-клеток была увеличена у пациентов с COVID-19, особенно у пациентов с умеренным или тяжелым заболеванием (фиг. 19a). Процент KIR+CD8+ Т-клеток также был повышен у пациентов с COVID-19 и коррелировал с тяжестью заболевания (фиг. 19b), а также с частотой аутоиммунных CD4+ Т-клеток (фиг. 19c). Кроме того, как аутоиммунные CD4+ Т-клетки, так и KIR+CD8+ Т-клетки были увеличены у пациентов с COVID-19 с васкулитом или эмболией и в меньшей степени у пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС) (фиг. 19d), которые являются распространенными осложнениями этого заболевания и, вероятно, вызваны чрезмерным воспалением. Два подмножества Т-клеток связаны с аутоиммунной иммунопатологией во время инфекции SARS-CoV-2. Тем не менее, мы не наблюдали существенной разницы в уровнях CD25hiCD127lowCD4+ Treg у пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами или пациентами с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания или осложнениями, предполагая, что Т-клетки KIR + CD8 + являются уникальным регуляторным механизмом, регулируемым во время инфекции SARS-CoV-2, чтобы конкретно контролировать перекрестную реактивность на самоантигены.

Мы также использовали общедоступные данные одноклеточной РНК-seq бронхоальвеолярных иммунных клеток пациентов с COVID-19 и здоровых людей, чтобы выяснить, присутствуют ли также Т-клетки KIR + CD8 + В жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) пациентов с COVID-19. CD8+ Т-клетки, экспрессирующие транскрипты KIR (KIR3DL1, KIR3DL2, KIR2DL3 или KIR2DL1), были обнаружены в BALF пациентов с COVID-19 с умеренным или тяжелым заболеванием, но не в BALF от здоровых контрольных групп (фиг. 19e), что указывает на то, что KIR+CD8+ Т-клетки также индуцируются в локальном месте инфекции.

Общность и неоднородность KIR+CD8+ Т-клеток

Чтобы лучше понять функциональные свойства этого типа клеток при различных обстоятельствах, мы интегрировали данные одноклеточной РНК-seq CD8+ Т-клеток периферической крови от здоровых субъектов, пациентов с рассеянным склерозом и пациентов с COVID-19 (сгенерированные с помощью платформы 10x Genomics) с использованием пакета Seurat. Общее количество CD8+ Т-клеток было спроецировано на двумерный UMAP, а неконтролируемая кластеризация идентифицировала 8 субпопуляций на основе экспрессии генов. KIR+CD8+ Т-клетки из разных состояний (здоровые, MS и COVID-19) образовали отдельный кластер с высокой экспрессией эффекторных генов (GZMB и PRF1), а также транскриптов KIR (фиг. 20a-b), выявляя общность KIR+CD8+ Т-клеток в физиологическом и болезненном статусе и их уникальность по сравнению с другими CD8+ Т-клетками.

Чтобы лучше понять сходство и неоднородность Т-клеток KIR+CD8+ при различных обстоятельствах и исследовать механизм их супрессивной активности к патогенным CD4+ Т-клеткам, мы выполнили одноклеточную РНК-seq на 4,512 KIR+CD8+ Т-клетках, отсортированных из крови здоровых субъектов с возрастом и полом (N=10) и пациентов с РС (N=2), SLE (N=6) или CeD (N=5) с использованием протокола Smart-seq2. Параллельно мы также проанализировали их α TCR и последовательности β . Неконтролируемая кластеризация этих KIR+CD8+ Т-клеток Сера идентифицировала 6 кластеров, причем кластеры от 1 до 3 в основном содержали расширенные KIR+CD8+ Т-клетки (≥ 2 клетки, экспрессирующие один и тот же TCR), а кластеры 5 и 6 состояли из нерасширенных клеток, экспрессирующих уникальные TCR (фиг. 20c). Расширенные клетки KIR+ в кластерах с 1 по 3 имели более высокие транскрипты для цитотоксических молекул (например, GZMH, GZMB и PRF1) и генов, связанных с эффекторными Т-клетками (например, FCGR3A, FGFBP2 и CX3CR1). Кластер 2, который был более ограничен расширенными клетками KIR+ у пациентов с РС, показал более высокие уровни генов, отвечающих на IFN типа I (включая IFIT1, IFIT2, IFIT3, MX1, RSAD2 и ISG15). Кластер 3, специфичный для расширенных клеток KIR+ из подмножества пациентов с HC и SLE, показал более высокую экспрессию генов, участвующих в гликолизе (например, GAPDH, GPI, ENO1 и PGK1) (фиг. 20d-e). Клетки в кластере 4 находились в переходном состоянии с потерей связанных с памятью признаков. Кластеры 5 и 6 (ограниченные неразвернутыми ячейками KIR+CD8+ Т) отображали память и наивные сигнатуры соответственно (фиг. 20e), и на его долю приходится небольшая доля от общего количества KIR+CD8+ Т-клеток. Клоны Т-клеток, экспрессирующие идентичные TCR, можно найти в разных кластерах, что указывает на возможные отношения линии. Кроме того, клонально расширенные Т-клетки KIR+CD8+ у пациентов с COVID-19 (идентифици-

рованные из предыдущих 10x Genomics scRNA-seq) показали более высокую экспрессию цитотоксических генов при одновременной регуляции наивных или связанных с памятью генов по сравнению с расширенными KIR+CD8+ Т-клетками. Таким образом, параллельно с клональной экспансией Т-клетки KIR+CD8+ могут потерять свои наивные или запоминающиеся атрибуты, войти в программу дифференцировки для эффекторных Т-клеток, а затем подавить аутореактивные CD4+ Т-клетки через цитотоксичность. Существуют общие черты, общие черты KIR+CD8+ Т-клеток от здоровых субъектов и различных заболеваний, но существует также гетерогенность (т.е. повышенная регулируемая передача сигналов IFN типа I и гликолиз в кластерах 2 и 3), связанная с различными заболеваниями или методами лечения.

Обсуждение

Здесь мы характеризуем KIR+CD8+ Т-клетки как новое регуляторное подмножество CD8+ Т-клеток у людей, которые подавляют патогенные CD4+ Т-клетки, возникающие в результате самореактивности при аутоиммунных расстройствах или перекрестной реактивности к аутоантигенам при инфекционных заболеваниях через цитотоксичность (фиг. 20f). Подобно перфорин- или Fas/FasL-зависимому подавлению самореактивных CD4+ Т-клеток мышьяками Ly49+CD8+ Т-клетками, человеческие KIR+CD8+ Т-клетки нацелены на патогенные CD4+ Т-клетки через их цитолитическую активность, поскольку расширенные KIR+CD8+ Т-клетки значительно повышали цитотоксические молекулы и увеличивали апоптоз в глиадин-специфических CD4+ Т-клетках, наблюдаемых в присутствии KIR+CD8+ Т-клеток. Мы часто наблюдали повышенную частоту KIR+CD8+ Т-клеток в крови, а также в воспаленных тканях пациентов с аутоиммунным заболеванием, и это положительно коррелирует с потенциально аутореактивными CD4+ Т-клетками с редким фенотипом, уникальным для глиадин-специфических клеток из CeD в случае СКВ. Это расширение KIR + CD8 + Т-клеток, коррелирующее с частотой этих аутоиммунных реакций, может действовать как механизм отрицательной обратной связи для улучшения патогенеза путем уничтожения аутореактивных Т-клеток.

Повышенные KIR+CD8+ Т-клетки вместе с CD4+ Т-клетками с тем же фенотипом, что и глиадин-специфические клетки в CeD, которые могут представлять собой самореактивные клоны, которые перекрестно реагируют с патогенами, были обнаружены у пациентов с COVID-19 и были связаны с аутоиммунными осложнениями. Поэтому основная роль Т-клеток KIR+CD8+ может заключаться в контроле самореактивных Т-клеток, возникающих в ходе инфекционного заболевания, вследствие их перекрестной реактивности на антигены, экспрессируемые конкретным патогеном. Это позволило бы организму поддерживать как можно более полный репертуар периферических Т-клеток, чтобы защитить себя от потенциальной инфекции патогенами, но при этом иметь возможность точно контролировать клоны Т-клеток с перекрестной реактивностью к собственным антигенам.

Интересно, что клонально расширенные Т-клетки KIR+CD8+ также обнаруживаются в периферической крови здоровых субъектов и имеют общие сигнатуры экспрессии генов с сигнатурами пациентов с аутоиммунными заболеваниями или COVID-19. Это указывает на то, что, по крайней мере, некоторые Т-клетки этого типа постоянно активны, хотя и не на очень высоких уровнях, наблюдаемых у пациентов с COVID-19 или у некоторых субъектов с аутоиммунитетом. Активация KIR+CD8+ Т-клеток может быть специфическим регуляторным механизмом для поддержания периферической толерантности даже у здоровых людей. Тот факт, что регуляторные Т-клетки CD4+ не повышены у пациентов с COVID-19, указывает на то, что их роль в периферической толерантности довольно отчетлива и, возможно, более общая, тогда как Т-клетки KIR + CD8 + могут быть особенно ориентированы на поддержание толерантности во время инфекции.

Таким образом, мы идентифицируем KIR + CD8 + Т-клетки как новое подмножество человеческих CD8 + Т-клеток, которое способно убивать патогенные Т-клетки, сохраняя при этом другие, аналогично Ly49 + CD8 + Т-клеткам у мышей. Они активны при широком спектре аутоиммунных заболеваний (например, РС, СКВ и СЕД), по крайней мере, при некоторых инфекционных заболеваниях (например, COVID-19) и в меньшей степени у здоровых взрослых. Этот тип периферической толерантности отличается от регуляторных Т-клеток CD4+ и, вероятно, дополняет их, которые представляют собой отдельную линию Т-клеток и, по-видимому, обычно неактивны у пациентов с COVID-19. Таким образом, Т-клетки KIR+CD8+ и описанные здесь свойства полезны как для понимания ключевой динамики в феномене иммунной дисрегуляции, так и в терапевтических приложениях. Мы также отмечаем увеличение редкого фенотипа CD4+ Т-клеток, что характерно для глиадин-специфических клеток, патогенных при целиакии, и повышенного при других аутоиммунных заболеваниях у пациентов с COVID-19. Взятые вместе эти данные указывают на то, что многие последствия у пациентов с COVID-19 могут носить аутоиммунный характер.

Человеческие образцы

В нашем исследовании группа пациентов с аутоиммунными заболеваниями соответствовала критериям классификации системной красной волчанки (СКВ)⁴³, целиакии (CED)⁴⁴ или рассеянного склероза (РС) соответственно. Сбор крови у пациентов с СКВ, CED или рассеянным склерозом был охвачен IRB-14734 (База данных иммунологических и ревматических заболеваний Стэнфордского университета: Изучение активности заболеваний и биомаркеров), IRB-20362 (Изучение молекулярных факторов, участвующих в патогенезе целиакии) и IRB-8629 (Понимание механизмов аллергии и иммунологическое ис-

следование). Кровь от здоровых испытуемых была запрошена в Стэнфордском центре крови или взята у здоровых добровольцев в соответствии с IRB-40146. Упомянутые выше протоколы были одобрены Отделом соответствия исследованиям Стэнфордского университета. PBMCs от пациентов с рассеянным склерозом также были получены из Центра рассеянного склероза Калифорнийского университета в Сан-Франциско (UCSF) в соответствии с протоколом, одобренным комитетом по исследованиям человека в UCSF. Информированное письменное согласие было получено от всех участников.

PBMCs были выделены из крови путем центрифугирования градиента плотности (Ficoll-Paque, GE Healthcare). Пациенты с COVID-19 и сбор проб. В набор вошли все взрослые с ОТ-ПЦР-положительным COVID-19. Информированное согласие было получено от каждого пациента или от законно уполномоченного представителя пациента, если пациент не смог предоставить согласие. Участники были исключены, если они принимали какие-либо экспериментальные лекарства (то есть те лекарства, которые не были одобрены регулирующим органом для использования при COVID-19). Тяжесть заболевания COVID-19 определялась так, как описано в литературе. Забор крови у пациентов с COVID-19 покрывался IRB-14734 и NCT04373148. Обработка НБМК COVID-19 для проточного цитометрического анализа была охвачена APB-3343-MD0620. Протоколы IRB и APB, упомянутые выше, были одобрены Отделом по соблюдению исследовательской практики Стэнфордского университета. Клинические метаданные были получены из системы электронных медицинских карт Стэнфордских клинических данных в соответствии с разрешением участника, а определения и диагнозы заболевания использовались в соответствии с Принципами внутренней медицины Харрисона, 20е.

Проточный цитометрический анализ

Для окрашивания использовались следующие флуоресцентные конъюгированные античеловеческие антитела: CD8a (RPA-T8), CD56 (5.1H11), KIR3DL1 (Dx9), KIR2DL2/L3 (Dx27), KIR2DL5 (UP-R1), TIGIT (A15153G), KLRG1 (SA231A2), CD244 (C1.7), CX3CR1 (2A9-1), CD28 (CD28.2), CD27 (0323), CCR7 (G043H7), T-bet (4B10), Helios (22F6), Granzyme B (QA16A02), Perform (B-D48), PD-1 (EH12.2H7), CD25 (M-A251), CD39 (A1), CD161 (HP-3G10), CD38 (HIT2), ICOS (C398.4A), CXCR3 (G025H7), CD45RA (HI100), CD4 (RPA-T4) и CD62L (DREG-56) (биолегенд); CD3 (UCHT-1), TCR β (IP26) и CD127 (HL-7R-M21) (BD); KIR2DL1 (клон#143211) и KIR3DL2 (клон#539304) (НИОКР). Замороженные образцы клеток размораживали и промывали в 10% FBS безоназой (Sigma-Aldrich, 1:10,000) в RPMI. После центрифугирования 450 г клетки обрабатывали разбавленным блоком FcR (BD) 1:20 в буфере FACS (0,5% BSA, 2 мМ ЭДТА в PBS) в течение 10 мин с последующим окрашиванием антителами против поверхностных молекул (30 мин, 4°C). Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксировали и пермеабилizировали с помощью буферного набора внутриклеточной фиксации и пермеабилзации (eBioscience), с последующим окрашиванием антителами против внутриклеточных антигенов (30 мин, 4°C). Клетки были получены на проточном питомере LSR II (BD), и данные были проанализированы с использованием FlowJo X. Мертвые клетки были исключены на основе окрашивания жизнеспособности красителя (LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain, ThermoFisher).

Функциональный анализ

Химотриптические переварители глютена были деамидированы рекомбинантной человеческой трансаглутаминазой 2, как описано ранее. НБМК были выделены из крови пациентов с HLA-DQ2.5+ CeD на 0-й день. CD8+ Т-клетки очищали из PBMCs с использованием микрошариков CD8 (Miltenyi) в соответствии с инструкциями производителя, окрашивали проточными антителами, а живые CD3 + CD56 - CD8 + KIR + или KIR- Т-клетки были отсортированы с помощью проточного питомера FACSAria Fusion (BD). Отсортированные Т-клетки KIR+ или KIR-CD8+ стимулировали бусинами против CD3/CD28 (Gibco) в соотношении 1:1 (1 мкл шариков на 4×10⁴ клетки), дополненными 50 ЕД/мл ИЛ-2 в 96-луночных пластинах в течение 18 ч. CD8-PBMCs стимулировали 250 мкг/мл деамидированного глютена или оставляли нестимулированными при 3×10⁵ ~ 1×10⁶/100 мкл на хорошо дополненный 50 Ед/мл ИЛ-2. В качестве питательной среды использовали X-VIVO 15 с гентамицином L-Gln (Lonza), дополненным 10% сывороткой АВ человека (Sigma-Aldrich). Через 18 ч анти-CD3/CD28 шарики удаляли из CD8+ Т-клеток магнитом, а к культуре CD8-PBMC добавляли Т-клетки KIR+ или KIR-CD8+ в соотношении 1:30. 50 U/mL ИЛ-2 был добавлен в культуры на 3-й день. Клетки собирали на 6-й день и окрашивали тетрамерами HLA-DQ2.5 10 мкг/мл, комплексованными с четырьмя соответствующими заболеванием и иммунодоминантными эпитопами глиадиновых Т-клеток (DQ2.5-glia- α 1a, QLQFPQPELPY; DQ2.5-glia- α 2, RQPELPYRQPE; DQ2.5-glia- ω 1, QQFPQPEQFP; DQ2.5-glia- ω 2, FPQPEQFPWQP) в течение 5 мин при комнатной температуре.

Магнитное обогащение шариков тетрамерположительными CD4+ Т-клетками осуществлялось так, как описано ранее. Клетки промывали буфером FACS, а затем окрашивали антителами против поверхностных молекул в течение 30 мин при 4°C. После двух промывок буфером FACS 10% клеток были зарезервированы для анализа FACS, в то время как 90% были помечены анти-PE микрошариками и подвергнуты обогащению магнитным шариком PE-конъюгированных тетрамер-положительных клеток с использованием одного столбца MACS в соответствии с протоколом производителя (Miltenyi). Клетки также были собраны на 3-й день для измерения связывания Annexin V (BD) на глиадин-специфических CD4+

Т-клетках. Все клетки были получены на проточном питомере LSR II (BD), закрыты на живых клетках CD3 + CD4 + CD8 - TCR $\alpha\beta$ + и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo X. Частоту тетрамерположительных клеток рассчитывали путем деления числа постобогащенных тетрамер+ CD4+ Т-клеток на количество CD4+ Т-клеток в образце дообогащения, умноженном на 9 (чтобы учесть тот факт, что для обогащения использовались 90% клеток).

Количественная оценка экспрессии генов объемной РНК-seq и анализ данных

Массовое секвенирование РНК проводилось так, как описано ранее. Живые Т-клетки KIR+ или KIR-CD8+ массово сортировали непосредственно на 350 мкл TRIzol (Qiagen) с помощью проточного питомера FACS Aria Fusion (BD). Общая РНК была извлечена из образцов TRIzol с использованием разделения хлороформа и осаждения изопропанола, а затем набора RNeasy Plus Mini (Qiagen) для очистки. После анализа биоанализатора 2100 библиотеки секвенирования были подготовлены с использованием RiboGone Mammalian rRNA Depletion Kit (Clontech) и SMARTer Stranded RNA-seq Kit (Clontech). Полученная библиотека была секвенирована на платформе HiSeq 4000 (Illumina) в Стэнфордском функциональном геномическом центре. Для каждого образца в библиотеке массового секвенирования РНК из секвенсора было получено 75 парных считываний пары оснований. Мы выровняли показания с эталонным геномом человека (NCBI GRCh38) с помощью STAR v2.7.0e50. Количество генов было количественно определено и нормализовано (TPM) с помощью Salmon51. Дифференциальный анализ экспрессии генов определяли с помощью функции DESeq в пакете DESeq2 R.

Тепловые карты были сгенерированы с помощью seaborn.clustermap на python. Графики анализа геномной онтологии были сгенерированы с помощью пакета R "clusterProfiler". Чтобы сгенерировать наборы генов для анализа обогащения набора генов (GSEA), мы выбрали 200 лучших генов, регулируемых в Т-клетках Ly49 + CD8 + по сравнению с Ly49-CD8+ Т-клетками у мышей EAE, и ранее сообщенные гены сигнатуры CD4 + Treg, идентифицированные у мышей. Эти мышинные гены были преобразованы в гомологические гены у людей и составлены в виде наборов генов для последующего анализа GSEA в человеческих KIR+ против KIR-CD8+ Т-клеток.

Анализ одноклеточной РНК-сек почек и синовиальных тканей

Матрицы уникального молекулярного идентификатора (UMI) клеток в почках (код присоединения SDY997) или синовиальных тканей (код присоединения SDY998), сгенерированные CEL-Seq2, были загружены из репозитория ImmPort, и последующий анализ был выполнен с использованием пакета Seurat 3.0. Клетки с менее чем 1000 обнаруженных генов, более 5000 обнаруженных генов или более 25% митохондриальных генов были отброшены. CD8+ Т-клетки (экспрессирующие транскрипты CD3D, CD3E, CD8A и CD8B) и CD4+ Т-клетки (экспрессирующие транскрипты CD3D, CD3E и CD4) были отобраны для стандартных последующих процедур логарифмической нормализации, отбора переменных генов и масштабирования данных.

Анализ одноклеточной РНК-seq бронхоальвеолярных иммунных клеток

Отфильтрованная матрица экспрессии одноклеточной РНК-seq иммунных клеток из бронхоальвеолярной промывочной жидкости 6 пациентов с тяжелой и 3 умеренной COVID-19 и 3 здоровых контрольных групп, сгенерированная 10x Genomics36, была загружена из сводки экспрессии генов под регистрационным номером GSE145926. CD8+ Т-клетки были идентифицированы для последующего анализа с использованием Seurat пакет 3.0.

Анализ одноклеточной РНК-seq, генерируемой 10x геномикой

Одноклеточные РНК-секВ Т-клеток из крови здоровых субъектов (N=10), пациентов с рассеянным склерозом (N=6) и пациентов с COVID-19 (N=25) из микрофлюидной капельной платформы (10x Genomics Chromium Single Cell 5' pair-end chemistry) были демультимплексированы, выровнены с эталонным геномом GRCh38 и преобразованы в матрицы подсчета генов с использованием Cell Ranger 3.1.0. Последующий анализ проводился с использованием пакета Seurat 3.0. Клетки с менее чем 800 обнаруженными генами, более 3000 обнаруженных генов или более 10% митохондриальных генов были отброшены. CD8+ Т-клетки (экспрессирующие CD8A и CD8B, но не транскрипты TRDC) от каждого человека были отобраны для дальнейшего анализа. Чтобы сделать подсчеты сопоставимыми между клетками, количество генов было нормализовано до 10000 считываний на клетку, а затем преобразовано в журнал. Мы идентифицировали высоковариабельные гены для каждого человека, а затем интегрировали данные экспрессии генов от всех людей, используя алгоритм обнаружения якоря интеграции Seurat. Мы выполнили уменьшение размерности PCA на интегрированных данных, затем кластеризовали ячейки с помощью алгоритма Лувена и визуализировали данные с помощью UMAP. Мы идентифицировали канонические гены маркеров клеточного типа, которые были сохранены в разных условиях, используя тест Wilcoxon rank-sum, реализованный в функции "FindConservedMarkers" пакета Seurat.

Количественная оценка экспрессии гена одноклеточной РНК-seq с помощью Smart-seq2 и анализ данных

Одноклеточный РНК-seq крови KIR+ CD8+ Т-клеток (живые CD3 + CD56-CD8 + TCR $\alpha\beta$ + KIR+ клетки) был выполнен с использованием протокола Smart-seq2 с некоторыми модификациями 40,53. Коротко говоря, отдельные клетки были отсортированы на 96-луночные пластины, содержащие 5 мкл лизис-

ного буфера (ингибитор РНКазы 0,8 ЕД/мкл (Clontech), ~5000 молекул ERCC (Консорциум внешнего контроля РНК), всплеск РНК (Ambion), 0,08% BioUltra Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 2 мкМ олиго-dT30VN (Integrated DNA Technologies, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'), 2 мМ Qiagen dNTP mix) в каждой скважине. Сразу после сортировки пластины запечатывали алюминиевым уплотнением (Axugen), центрифугировали, замораживали на сухом льду и затем хранили при -80°C. Перед обратной транскрипцией пластины размораживали на льду и лизировали при 72°C в течение 3 мин. 5 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ DTT, 2 мкМ TSO (Exiqon, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATrGrGrG-3'), 20 U/мкл SMARTScribe Reverse Transcriptase (Takara), 2 U/μL

Ингибитор РНК-азы (Clontech) и 2×.

В каждую скважину добавляли буфер первой нити и проводили обратную транскрипцию путем инкубации скважин на термоциклере (Eppendorf) при 42°C в течение 90 мин, 10 циклов при 50°C в течение 2 мин, 42°C в течение 2 мин и прекращается нагреванием при 70°C в течение 15 мин. Впоследствии в каждую скважину добавляли 15 мкл ПЦР-смеси, содержащей 1,67× KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, KK2602) и 0,17 мкМ IS PCR праймер (IDT, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') и синтез второй цепи выполняли на термоциклере (Эппендорф) с использованием следующей программы: 1) 98°C в течение 3 мин, 2) 22 цикла 98°C в течение 20 с, 67°C в течение 15 с и 72°C в течение 6 мин и 3) 72°C в течение 5 мин. 1 мкл продуктов кДНК использовали для реакции TCR PCR. Остальные 24 мкл продуктов кДНК подвергали очистке бусинами AMPure XP (Beckman Coulter) на автоматизированной рабочей станции Biomek FXP (Beckman Coulter): 15,6 мкл бусин Ampure XP (0,65×) добавляли к каждому образцу и смешивали путем пипетки вверх и вниз тридцать раз; смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, чтобы ДНК связывалась с шариками; затем 96-луночную пластину помещали на магнит на 5 мин, и жидкость удаляли, пока образцы находились на магните; шарики промывали 180 мкл 80% (об./об.) раствором этанола дважды и сушили на воздухе на магните в течение 6 мин; В каждую лунку добавляли 25 мкл воды, смешивали путем пипетки вверх и вниз десять раз, и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин; пластину помещали на магнит на 3 мин и переносили супернатанты на новую 96-луночную пластину; наконец, 2 мкл супернатантов были подвергнуты контролю качества с использованием капиллярного электрофореза на анализаторе фрагментов (Agilent Technologies) Стэнфордской установкой белков и нуклеиновых кислот.

кДНК в 96-луночных пластинах переносили в 384-луночные пластины Low Volume Serial Dil. (LVSD) (TTP Labtech) и разбавляли до 0,16 нг/мкл с помощью жидкостного обработчика Mosquito X1 (TTP Labtech). Библиотеки секвенирования Illumina были подготовлены, как описано выше 54, с использованием жидкостного обработчика Mosquito HTS (TTP Labtech). Вкратце, тагментацию проводили на 0,4 мкл двухцепочечной кДНК с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК Nextera XT (Illumina, FC-131-1096). Каждую лунку смешивали с 0,8 мкл тагментационным буфером ДНК Nextera (Illumina) и 0,4 мкл Amplicon Tagment Mix (Illumina), затем инкубировали при 55°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,4 мкл нейтрализующего буфера тагмента (Illumina) и центрифугированием при комнатной температуре при 3000 г в течение 5 мин. Индексирование реакций ПЦР проводили путем добавления 0,8 мкл предварительно смешанных 5 мкМ i5 и i7 уникальных двухиндексирующих праймеров (IDT, настроенный) и 1,2 мкл смеси Nextera NPM (Illumina). ПЦР-амплификацию проводили на сенсорном™ термоциклере C1000 с 384-луночным реакционным модулем (Bio-rad) с использованием следующей программы: 1) 72°C в течение 3 мин, 2) 95°C в течение 30 с, 3) 12 циклов 95°C в течение 10 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 1 мин и 4) 72°C в течение 5 мин. После подготовки библиотеки колодцы каждой библиотечной пластины были объединены с помощью жидкостного обработчика Mosquito HTS (TTP labtech). За объединением последовали две очистки с использованием 0,65 × и 1 × бусин AMPure XP (Beckman Coulter) соответственно. Качество библиотеки оценивалось биоанализатором Agilent 2100 и нормализовалось до 5 нМ. Библиотеки были секвенированы в системе секвенирования HiSeq4000 (Illumina) в Стэнфордском функциональном геномическом центре, получая парные чтения 150 бит в секунду.

Stanford Functional Genomics Facility извлекал и генерировал файлы FASTQ для каждой ячейки, отличающиеся уникальными двойными адаптерами индекса. Показания были выровнены по геному GRCh38 с помощью STAR v2.6.1d. Обилие транскриптов было количественно определено с помощью HTSeq v0.5.4p5.

Стандартные процедуры фильтрации, логарифмической нормализации, отбора переменных генов, уменьшения размерности и кластеризации были выполнены с использованием пакета Seurat 3.0. Короче говоря, клетки с менее чем 800 обнаруженными генами, более 5000 обнаруженных генов или более 15% митохондриальных генов были отброшены. Чтобы сделать количество сопоставимым между клетками, количество генов было нормализовано до 10000 считываний на клетку, а затем преобразовано в журнал. После уменьшения размерности PCA клетки были сгруппированы с помощью алгоритма Лувена и визуализированы с использованием UMAP. Анализ дифференциальных выражений проводился с использованием теста Wilcoxon rank-sum, реализованного в функции 'FindAllMarkers' пакета Seurat. Значительно

дифференциально экспрессированные гены были определены как гены с изменением логарифмической складки $> 0,5$ и скорректированным Бонферрони р-значением $< 0,05$.

Одноклеточный TCR-seq. TCR-seq был выполнен с использованием нашего ранее разработанного метода одноклеточного парного секвенирования TCR с некоторыми модификациями. Вкратце, для первой реакции TCR 1 мкл продуктов кДНК Smart-seq2 был предварительно обогащен ДНК-полимеразой HotStarTaq (Qiagen) с использованием мультиплексной ПЦР с несколькими праймерами области V α и V β , праймерами области C α и C β . Первая ПЦР-реакция в 25 циклов проводилась в соответствии с инструкциями завода-изготовителя с использованием следующих условий цикла: 95°C 15 мин; 94°C 30 с, 62°C 1 мин, 72°C 1 мин \times 25 циклов; 72°C 10 мин; 4°C. Далее 1 мкл аликвоту первой реакции использовали в качестве шаблона для второй ПЦР 12 мкл с использованием ДНК-полимеразы HotStarTaq (Qiagen) с несколькими внутренне вложенными праймерами TCRV α , TCRV β , TCRC α и C β . Условия езды на велосипеде были: 95°C 15 мин; 94°C 30 с, 64°C 1 мин, 72°C 1 мин \times 25 циклов; 72°C 7 мин; 4°C. 1 мкл аликвота второго продукта ПЦР была использована в качестве шаблона для третьей 20-мкл ПЦР-реакции, которая включает штрих-коды и позволяет секвенировать на платформе Illumina MiSeq. Для третьей и заключительной реакции ПЦР для секвенирования TCR амплификацию проводили ДНК-полимеразой HotStarTaq в течение 36 циклов с использованием 5'-штрихкодирующего праймера (0,05 мкМ), содержащего общую 23-базовую последовательность и 3'-баркодирующий праймер (0,05 мкМ), содержащий последовательность третьего внутренне вложенного праймера C α и/или C β , и праймеров Illumina Paired-End. Условия езды на велосипеде были: 95°C 15 мин; 94°C 30 с, 66°C 30 с, 72°C 1 мин \times 36 циклов; 72°C 10 мин; 4°C. Продукты ПЦР комбинировали в равной пропорции по объему, проводили на 1,2% агарозном геле, а полосу от 350 до 380 бп иссекали и очищали гелем с использованием набора для экстракции геля QIAquick (Qiagen). Затем этот очищенный продукт был секвенирован на платформе Miseq (Illumina), получая 2 \times 250 бит в секунду.

Анализ пролиферации клеток искусственно

CD8+ Т-клетки очищали из МПК здоровых доноров с использованием микрошариков CD8 (Miltenyi) по инструкции производителя, окрашивали проточными антителами, а живые CD3+CD56-CD8+KIR+ или KIR-Т клетки сортировали с помощью проточного питометра FACSAria Fusion (BD). Отсортированные Т-клетки KIR+ или KIR-CD8+ стимулировали бусинами против CD3/CD28 (Gibco) в соотношении 1:1 (1 мкл шариков на 4 \times 10⁴ клетки), дополненными 50 ЕД/мл IL-2 в 96-луночных пластинах в течение 18 ч. CD8-BBMC были помечены CellTrace Violet (CTV, ThermoFisher) в соответствии с инструкцией производителя. 1 мкг/мл анти-CD3 (UCHL-1) покрывали на 96-луночной пластине в 50 мкл PBS на скважину при 4°C в течение ночи. После удаления анти-CD3/CD28 микрошариков, KIR+ и KIR-CD8+ Т-клетки смешивали с мечеными CTV CD8-PBMCs в соотношении 1:30 и культивировали в 96-луночной пластине, предварительно покрытой 1 мкг/мл анти-CD3. Через 4 или 6 дней клетки собирали и анализировали разбавление CTV в CD4+ Т-клетках методом проточной цитометрии.

Статистический анализ

Никаких конкретных статистических методов для предопределения размера выборки не использовалось. Все результаты представлены как средняя \pm SEM. Было проанализировано значение разницы между группами, как описано в рисунке легенды. Коэффициенты корреляции Пирсона с двуххвостыми значениями Р были определены в корреляционном анализе. Значения $P < 0,05$ были признаны статистически значимыми. Все статистические анализы проводились с использованием версии программного обеспечения GraphPad Prism.

Каждая публикация, цитируемая в настоящей спецификации, настоящим включается путем ссылки в полном объеме для всех целей.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, клеточными линиями, видами или родами животных и описанными реагентами, как таковые могут варьироваться. Следует также понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Используемые здесь формы единственного числа "a", "and" и "the" включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "клетку" включает множество таких клеток, а ссылка на "культуру" включает ссылку на одну или более культур и их эквивалентов, известным специалистам в данной области, и так далее. Все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается для обычного специалиста в области техники, к которой относится данное изобретение, если четко не указано иное.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная популяция CD8+ KIR+ регуляторных Т-клеток человека, ограниченных классическим антигеном МНС класса I, которые избирательно подавляют активность CD4+ Т-клеток, реагирующих на иницирующий антиген, но сами не активируются иницирующим антигеном.

2. Способ увеличения у индивидуума *in vivo* популяции CD8+ KIR(*)+ человеческих Т-клеток-супрессоров, ограниченных классическим антигеном МНС класса I, которые избирательно подавляют активность CD4+ Т-клеток, чувствительных к антигену-мишени; но сами не активируются антигеном-мишенью, включающий иммунизацию индивидуума регуляторным пептидом.

3. Популяция регуляторных Т-клеток по п.1, где CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека:

(i) обогащены из образца, полученного от индивидуума после иммунизации;

(ii) обогащены из образца, полученного от индивидуума после вспышки аутоиммунного заболевания;

(iii) обогащены из образца, полученного от индивидуума после заражения, дополнительно необязательно, где инфекция представляет собой инфекцию SARS-CoV-2; или

(iv) обогащены аффинным отбором для CD8 и ингибирующего белка KIR, дополнительно необязательно, где ингибирующий белок KIR представляет собой один или несколько из KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR3DL1.

4. Способ скрининга популяции регуляторных Т-клеток по п.1 на антигенную специфичность, включающий в следующем порядке:

(i) экспрессию рецепторов Т-клеток (TCR) регуляторных Т-клеток в виде растворимого мультимера;

(ii) контактирование с растворимым мультимером в анализе связывания с библиотекой разнообразных пептидов в контексте МНС и выбор МНС-пептида, который связывается с рецептором Т-клеток;

(iii) проведение нескольких раундов отбора и

(iv) определение антигенной специфичности регуляторных Т-клеток путем секвенирования выбранного пептидного антигена.

5. Способ снижения ответа CD4+ Т-клеток на антиген-мишень у субъекта, включающий введение эффективной дозы CD8+ KIR+ регуляторных Т-клеток человека по п.1.

6. Способ по п.5, в котором антиген-мишень является собственным антигеном.

7. Способ по п.5 или 6, в котором CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека экспрессируют один или более из KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR3DL1.

8. Способ по любому из пп.5-7, в котором CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека ограничены антигеном МНС класса I, ассоциированным с аутоиммунным заболеванием.

9. Способ по любому из пп.5-8, в котором CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека ограничены антигеном МНС класса I, отличным от МНС, ассоциированного с аутоиммунным заболеванием.

10. Способ по п.5, в котором CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека экспрессируют TCR, отличный от нативного TCR.

11. Способ по любому из пп.5-10, в котором регуляторные Т-клетки CD8+ KIR+ человека составляют в терапевтически эффективной единичной дозе.

12. Способ по любому из пп.5-11, в котором регуляторные Т-клетки CD8+ KIR+ человека были получены из образца индивидуума после (a) иммунизации иницирующим антигеном; (b) вспышки аутоиммунного заболевания или (c) инфекции.

13. Способ по п.12, в котором образцом является периферическая кровь, ликвор, синовиальная жидкость или образец для биопсии.

14. Способ по п.12, в котором образец был получен от индивидуума через 10-20 дней после иммунизации или вспышки аутоиммунного заболевания.

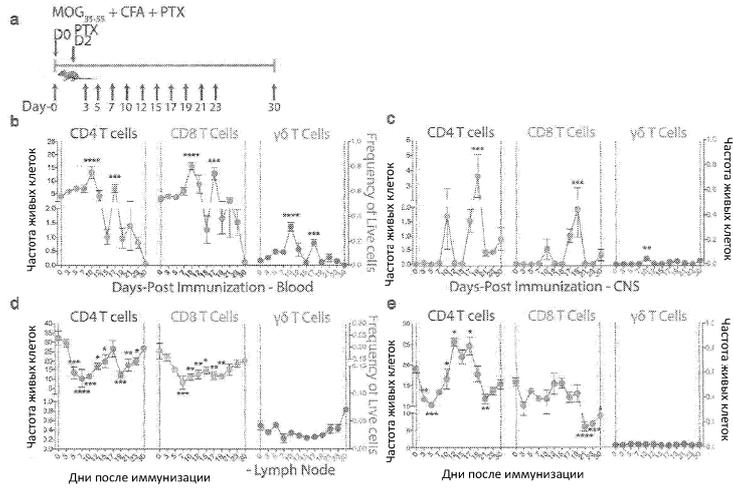
15. Способ по п.12, в котором иницирующий антиген представляет собой аутоантиген или регуляторный пептид.

16. Способ по п.12, в котором инфекцией является инфекция SARS-CoV-2.

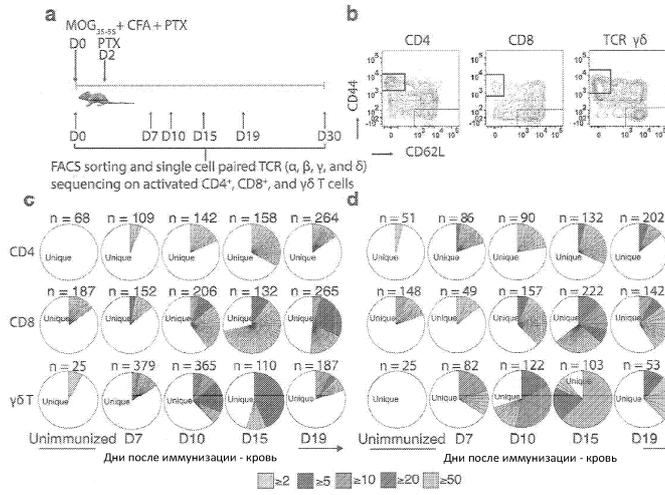
17. Способ по любому из пп.5-16, в котором CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека были обогащены путем аффинного отбора для CD8 и ингибирующего белка KIR или размножены *in vitro*.

18. Способ по любому из пп.5-11, в котором CD8+ KIR+ регуляторные Т-клетки человека были получены путем контакта с иммуногеном *in vitro*.

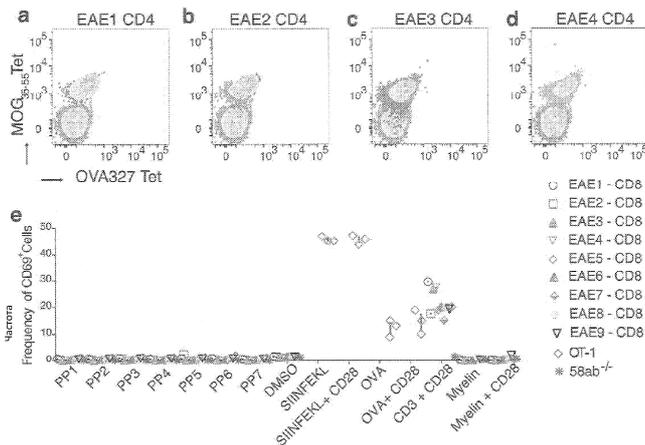
19. Способ по п.18, в котором иммуноген представляет собой регуляторный пептид.



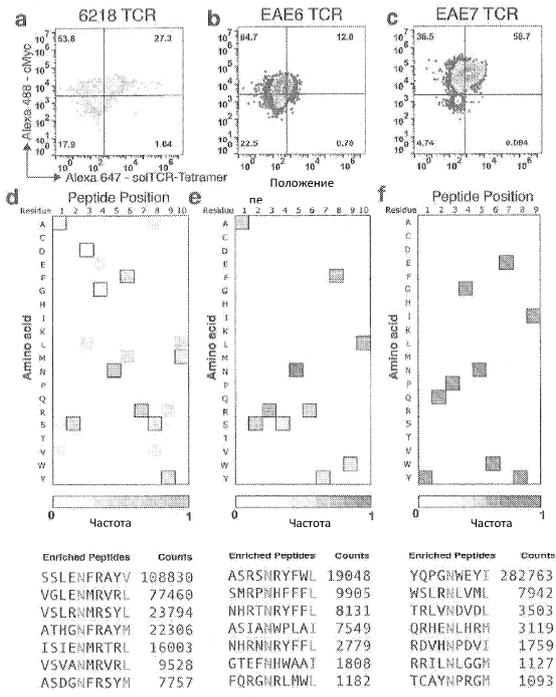
Фиг. 1



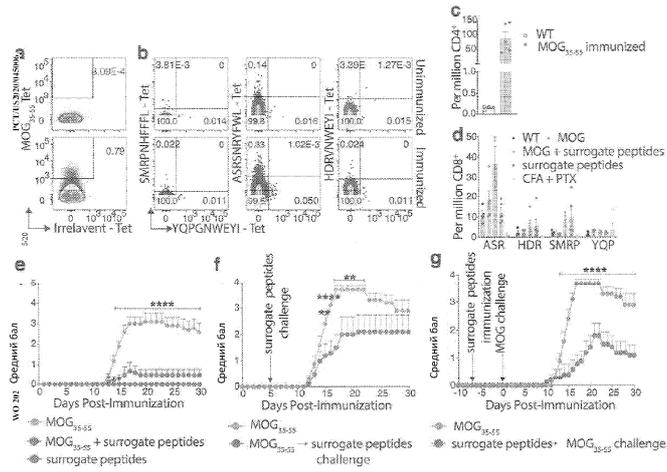
Фиг. 2



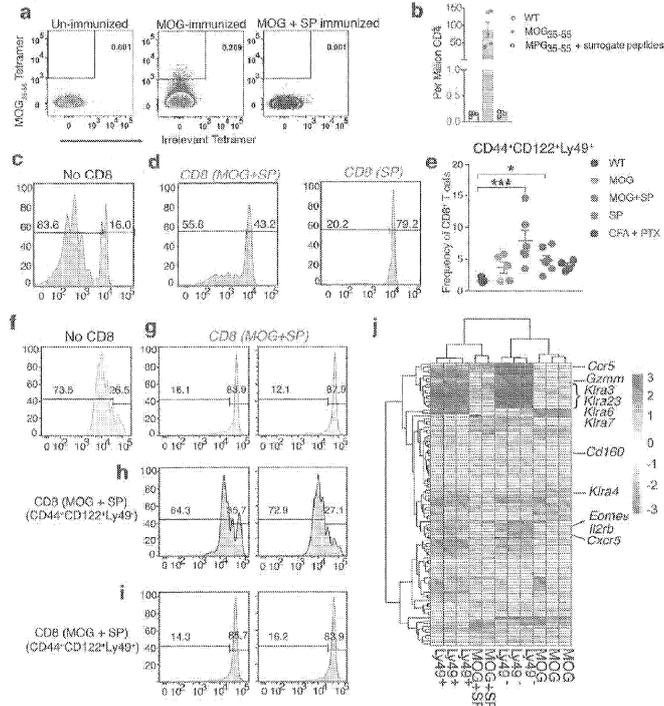
Фиг. 3



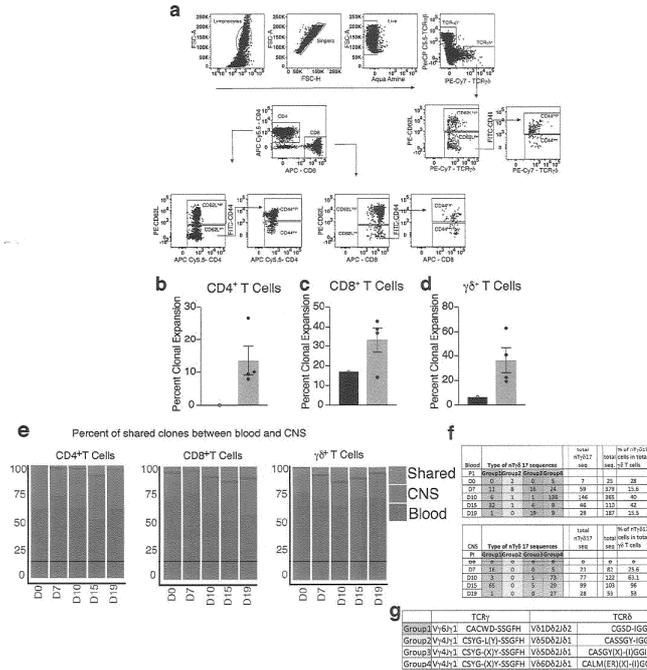
Фиг. 4



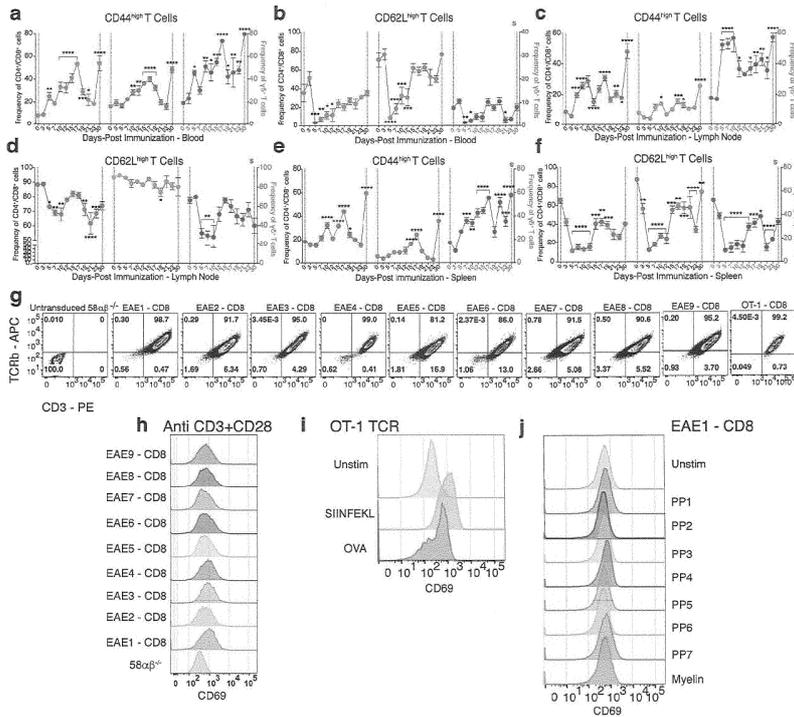
Фиг. 5



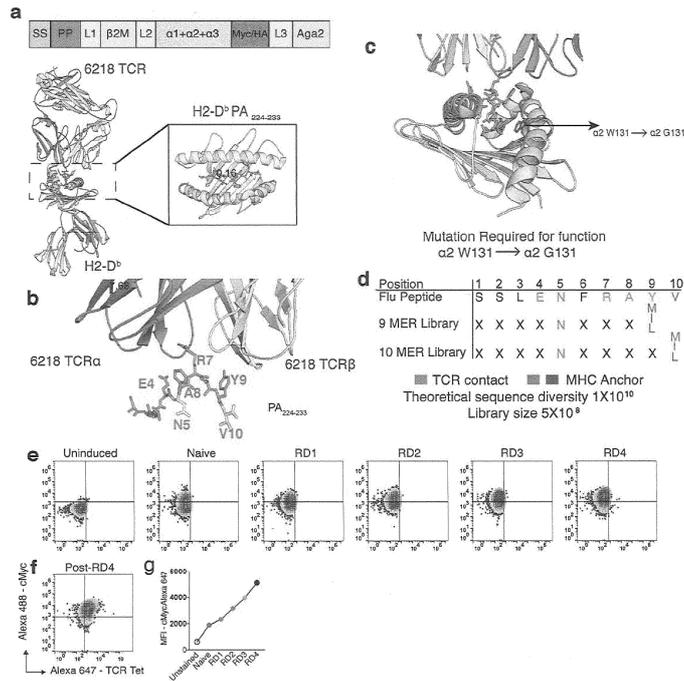
Фиг. 6



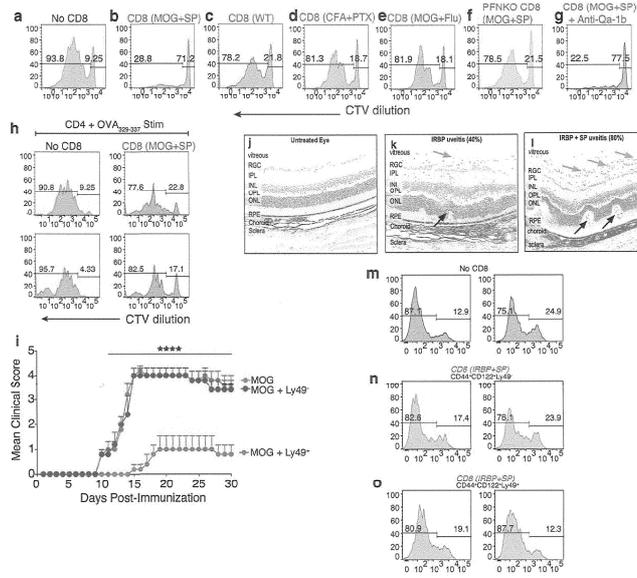
Фиг. 7



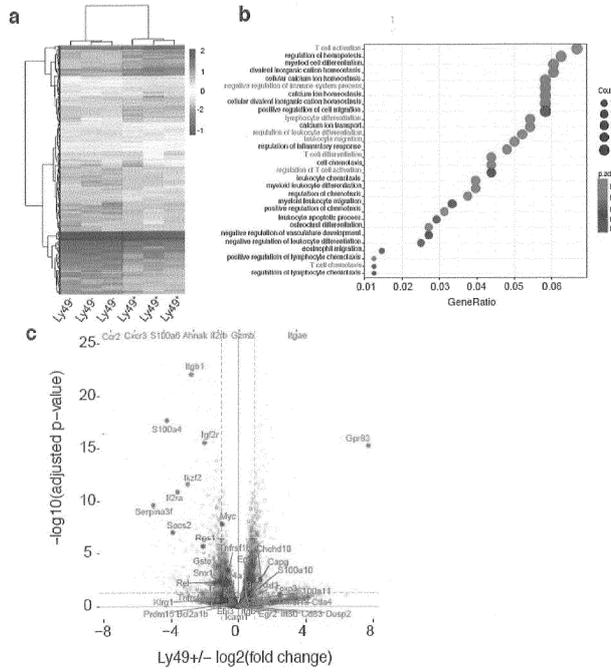
Фиг. 8



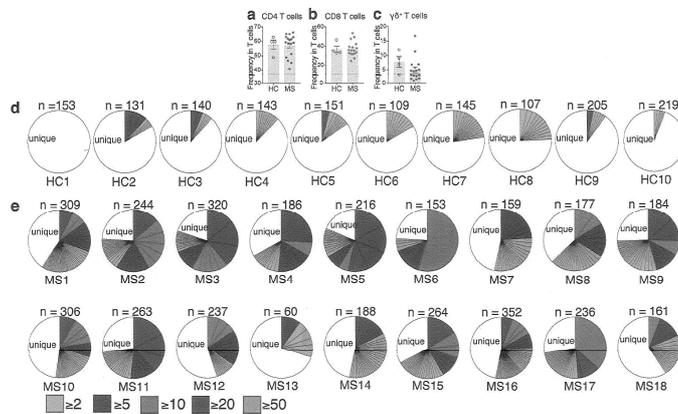
Фиг. 9



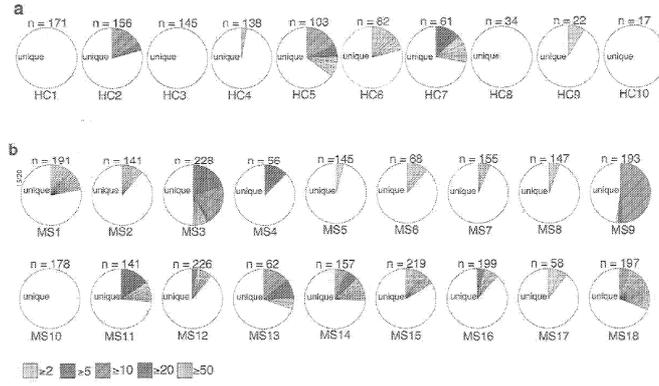
Фиг. 12



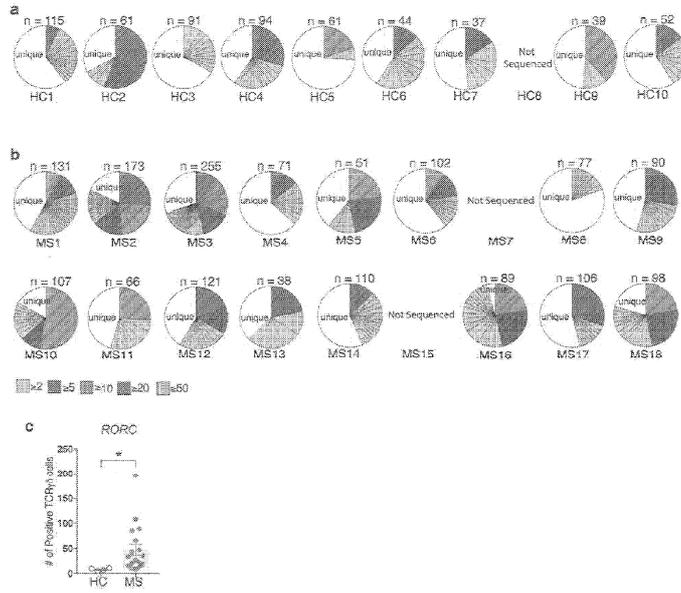
Фиг. 13



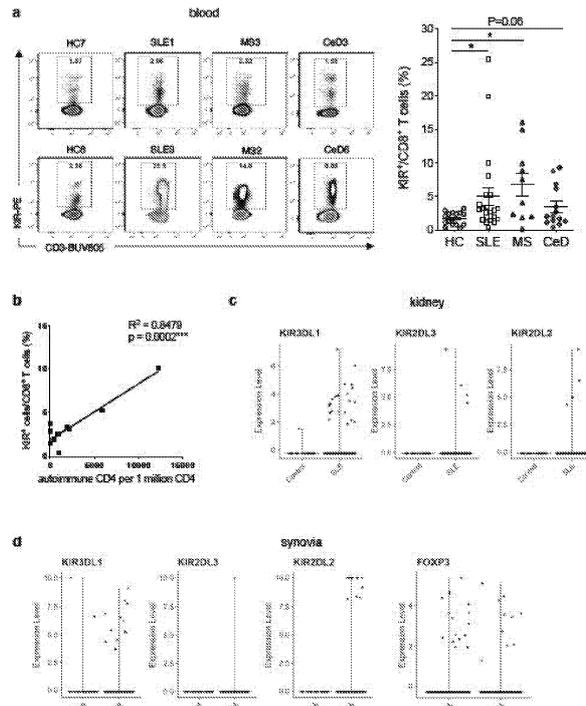
Фиг. 14



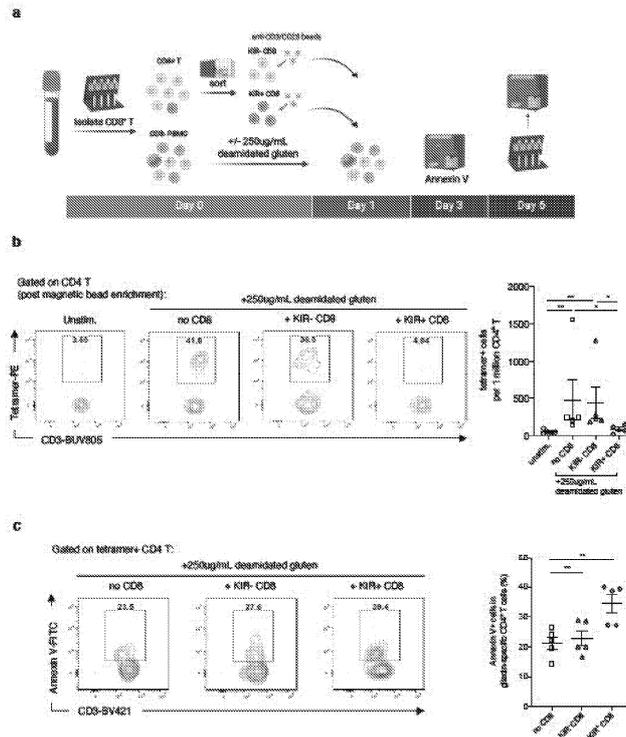
Фиг. 15



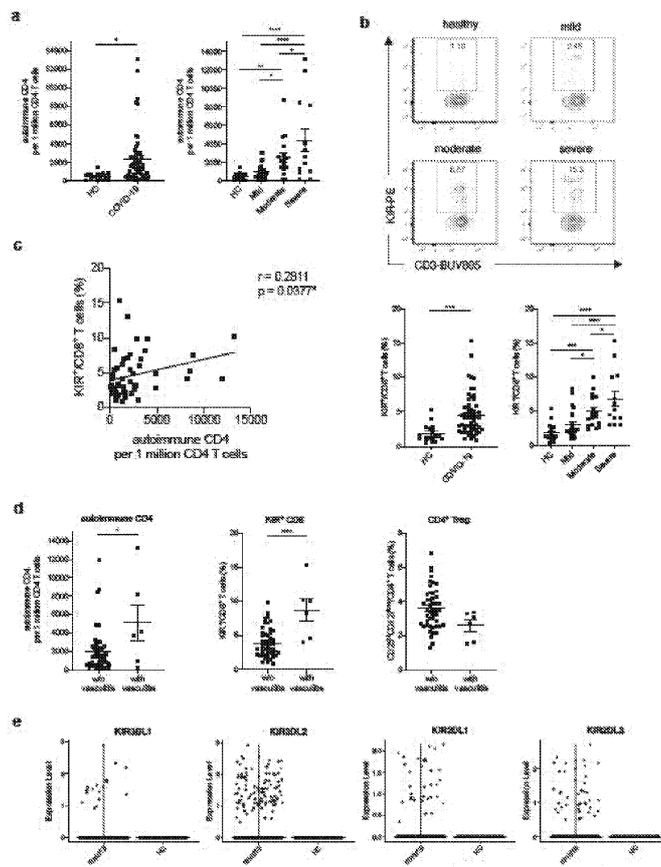
Фиг. 16



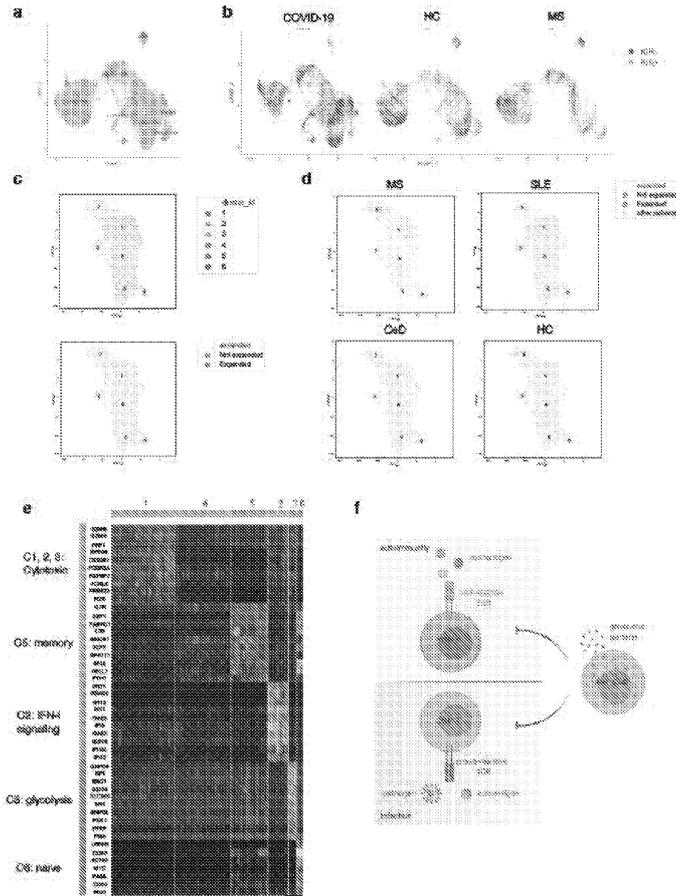
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

