

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 25.03.2024
Принята к печати 08.05.2024



EDN: ZNMOLO

Контактная информация:

Ведмедская Виктория Андреевна,
младший научный сотрудник лаборатории
трансплантационной иммунологии
и иммунотерапии гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: viktorija.zubachenko@dgoi.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-48-59

Опыт изготовления гаплоидентичного клеточного продукта, обогащенного Т-регуляторными лимфоцитами

В.А. Ведмедская, Д.Е. Першин, М.С. Фадеева, Т.А. Созонова, Е.А. Малахова,
Е.А. Кулаковская, О.Б. Лодоева, Э.Я. Мусаева, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченко,
Д.С. Осипова, Е.А. Бадрин, В.Е. Бельчиков, А.К. Мелькова, Л.Н. Шелихова, Д.Н. Балашов,
М.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) остается основным жизнеугрожающим иммунологическим осложнением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Несмотря на современные фармакологические возможности профилактики и терапии данного состояния, все еще сохраняется потребность в поиске новых подходов к его разрешению. В настоящее время в мировой клинической практике появляется все больше опыта в области применения клеточных продуктов (КП) Т-регуляторных клеток (T_{reg}) для лечения резистентной РТПХ. Описан ряд альтернативных протоколов производства КП для T_{reg} -терапии. Мы изучили возможности получения и использования T_{reg} в качестве клеточной терапии и представляем данные нашего опыта изготовления гаплоидентичного T_{reg} -обогащенного КП (T_{reg} КП) путем комбинации методик иммуномагнитной селекции $CD25^+$ и сортировки на основе проточной цитофлуориметрии. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В исследовании приведена характеристика процессов производства 9 T_{reg} КП. Согласно описанному в нашей работе протоколу производства, можно получить КП, соответствующий заданным характеристикам, необходимым для одобрения к клиническому применению. Контроль качества включал оценку клеточного состава, жизнеспособности и микробиологической безопасности продукта и был выполнен на всех основных этапах производства. Финальный КП характеризуется стабильно высоким содержанием FoxP3-экспрессирующих T_{reg} (медиана составила 98%) с медианой жизнеспособности 99,1% и обладает высоким потенциалом функциональной эффективности. Таким образом, протокол получения T_{reg} КП путем комбинации методик иммуномагнитной селекции $CD25^+$ и цитофлуориметрического клеточного сортировки может быть использован для клинического применения в целях терапии РТПХ.

Ключевые слова: реакция «трансплантат против хозяина», трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, клеточные продукты, Т-регуляторные клетки, иммуномагнитная селекция $CD25^+$, цитофлуориметрический клеточный сортировка

Ведмедская В.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 48–59. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-48-59

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 25.03.2024

Accepted 08.05.2024

Experience in manufacturing a haploidentical biomedical cell product enriched with regulatory T-lymphocytes

V.A. Vedmedskaya, D.E. Pershin, M.S. Fadeeva, T.A. Sozonova, E.A. Malakhova, E.A. Kulakovskaya,
O.B. Lodoeva, E.Ya. Musaeva, Ya.O. Muzalevskii, A.S. Kazachenok, D.S. Osipova, E.A. Badrin, V.E. Belchikov,
A.K. Melkova, L.N. Shelikhova, D.N. Balashov, M.A. Maschan

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Graft-versus-host disease (GVHD) remains the main life-threatening immunologic complication of hematopoietic stem cell transplantation. Despite modern pharmacological approaches for preventing and treating GVHD, there remains a need for new approaches to cure GVHD. Currently, more and more clinical experience is emerging globally in the field of using regulatory T-cell (T_{reg}) therapies for the treatment of refractory GVHD. Manufacturing cell products for T_{reg} therapies has a wide range of protocol variations. We have developed an approach of T_{reg} manufacturing for cell therapy and present data from our experience in manufacturing a haploidentical T_{reg} cell product by combining $CD25^+$ immunomagnetic selection with closed system flow-based cell sorting methods. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The study describes the processes of producing 9 T_{reg} cell products. According to the manufacturing protocol described here, it is possible to obtain a cell product that meets the quality control requirements necessary for approval for clinical use. Quality control includes the assessment of the cell composition, viability, and microbiological safety of the product, and is performed at all major stages of production. The final cell product is characterized by consistently high levels of FoxP3-expressing T_{reg} (median: 98%), with a median cell viability of 99.1%, and has a high potential for functional efficacy. Thus, the protocol for producing T_{reg} cell products by combining $CD25^+$ immunomagnetic selection with flow cytometry-based cell sorting methods can be used for the clinical treatment of GVHD.

Key words: graft-versus-host disease, hematopoietic stem cell transplantation, cell products, regulatory T-cell, $CD25^+$ immunomagnetic selection, flow cytometry-based cell sorting

Vedmedskaya V.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 48–59.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-48-59

Correspondence:
Victoria A. Vedmedskaya,
a junior researcher at the Laboratory of
Transplantation Immunology
and Immunotherapy of Hemoblastoses
of the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: viktorija.zubachenko@dgoi.ru

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является основной терапевтической опцией для целого спектра онкологических и гематологических заболеваний, а также для ряда врожденных иммунологических и некоторых других наследственных патологий. Одним из наиболее частых и жизнеугрожающих осложнений после алло-ТГСК остается развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [1–3]. За последние несколько десятилетий был совершен огромный провыв в использовании иммуносупрессивных препаратов для профилактики и лечения РТПХ. Но, несмотря на это, развитие РТПХ является по-прежнему острой проблемой, затрагивающей большое число пациентов, в связи с чем поиск альтернативных методов лечения остается актуальной задачей.

В настоящий момент описаны различные механизмы иммунных процессов, лежащих в основе патофизиологии РТПХ [4]. Принято считать, что основным механизмом является повреждение донорскими аллоспецифичными Т-лимфоцитами тканей реципиента. Процесс инициируется в результате активации донорских Т-лимфоцитов в трансплантате после распознавания антигенов, представленных на антигенпрезентирующих клетках реципиента. Данный процесс запускает клональную пролиферацию эффекторных донорских Т-клеток ($T_{эфф}$) с последующей их миграцией к тканям-мишеням, синтезом провоспалительных цитокинов и реализацией цитотоксических функций [5].

На развитие РТПХ влияют различные факторы, такие как степень несоответствия антигенов гистосовместимости между донором и реципиентом, а также подлежащий провоспалительный фон в тканях, сформированный в условиях применения высокодозной химио- и лучевой терапии. Кроме того, фармакологическое сопровождение ТГСК, режимы кондиционирования и иммуносупрессивная профилактика развития РТПХ влияют на баланс клеток иммунной системы, приводя к длительной лимфопении в ранний посттрансплантационный период. В свою очередь, длительное нахождение клеток иммунной системы в несбалансированном состоянии препятствует гармоничному восстановлению субпопуляций лимфоцитов, приводя к отсроченной иммунореконституции и увеличивая риски инфекционных осложнений [6, 7]. Понимание всех вышеупомянутых механизмов имеет решающее значение для разработки эффективных стратегий профилактики и лечения РТПХ.

Согласно данным литературы, на мышиных моделях многократно была продемонстрирована ключевая роль Т-регуляторных клеток ($T_{рег}$) в разрешении процессов РТПХ [8, 9]. Кроме того, известно, что их персистенция в раннем посттранспланти-

онном периоде обеспечивает необходимый уровень периферической толерантности, тем самым препятствуя развитию патологических процессов, лежащих в основе РТПХ [6, 10–12]. В условиях процедуры ТГСК $T_{рег}$ обеспечивают индукцию толерантности к аллоантигенам, способствуя более гармоничному взаимодействию клеток донора и реципиента [13, 14].

$T_{рег}$ впервые были описаны группой S. Sakaguchi и соавт. как популяция $CD4^+$ Т-лимфоцитов с высокой плотностью экспрессии рецептора $CD25$ (α -цепь рецептора интерлейкина-2) и иммуносупрессивными и регуляторными свойствами [15]. Популяция $T_{рег}$ крайне немногочисленна (порядка 1–2% среди всех клеток крови) и не имеет уникального маркера на своей поверхности. В литературе можно встретить различные подходы к классификации $T_{рег}$, но все они так или иначе сводятся к 2 основным популяциям: центральные, или естественные, $T_{рег}$ тимического происхождения и индуцированные, или периферические, $T_{рег}$ [16]. Дифференциация этих популяций между собой заключается в особенностях эпигенетического регулирования транскрипционного фактора FoxP3 – белка $T_{рег}$, являющегося одновременно и ключевым маркером, и основой их функциональности [17]. Деметилированная $T_{рег}$ -специфическая область ($T_{рег}$ -specific demethylated region, TSDR) определяет перманентную экспрессию генов, поддерживающих постоянство экспрессии FoxP3 в $T_{рег}$ -лимфоцитах тимического происхождения [18]. Кроме этого, общую популяцию $T_{рег}$ можно подразделить на пул наивных клеток и $T_{эфф}$, в зависимости от их статуса дифференцировки [19]. Наивные $T_{рег}$ не встречались со специфичным к своему Т-клеточному рецептору антигеном и находятся во вторичных лимфоидных органах. При встрече с антигеном они активируются и дифференцируются в $T_{рег}$ -лимфоциты центральной памяти и $T_{эфф}$, мигрируя в периферические ткани [20, 21].

Современные фармацевтические подходы к контролю РТПХ достаточно вариативны и не всегда возможны к использованию в полном объеме ввиду своей токсичности. В связи с этим поиск новых терапевтических подходов, в том числе и в области адоптивных клеточных технологий, становится актуальной и важной задачей. Первые результаты клинического применения $T_{рег}$ в качестве терапии РТПХ были получены Р. Trzonkowski и соавт. в 2009 г. [22]. Это исследование продемонстрировало потенциальные преимущества адоптивного переноса $T_{рег}$ у пациентов с острой и хронической РТПХ. Инфузия $T_{рег}$, полученных от гаплоидентичных доноров, приводила к улучшению клинической картины РТПХ, что позволяло снизить объем иммуносупрессии у пациентов. Этот подход продемонстрировал многообещающую способность $T_{рег}$ модулировать иммунный ответ у

пациентов с РТПХ, что в дальнейшем было подтверждено во многих работах, посвященных как солидной трансплантологии, так и ТГСК [7, 23–25].

За последнее десятилетие стремительный прогресс технологий в сфере биомедицины привел не только к расширению направлений, но и к увеличению их доступности. Все больший интерес направлен на развитие клеточных технологий, в частности адоптивного переноса различного рода клеток, полученных прямой селекцией из биоматериала либо же культивированных *ex vivo* с иммуномодулирующей целью [26–28]. Несмотря на рост количества клинических исследований $T_{\text{рег}}$ -терапии, на данный момент не существует универсального способа изготовления клеточного продукта (КП), обогащенного $T_{\text{рег}}$ ($T_{\text{рег}}$ КП).

Как правило, методы изготовления $T_{\text{рег}}$ КП основываются на иммуномагнитной сепарации клеток, флуоресцентном клеточном сортинге либо сочетании этих подходов. Также активно разрабатываются протоколы дальнейшей экспансии $T_{\text{рег}}$ -лимфоцитов, полученных вышеупомянутыми методами. Однако крайне вариабельные подходы к условиям получения, культивирования и применения $T_{\text{рег}}$ затрудняют их сравнительный анализ [27, 29]. Все применяемые технологии являются дорогостоящими и достаточно трудоемкими процедурами, а их комбинации лишь увеличивают стоимость и ограничивают доступность $T_{\text{рег}}$ -терапии.

В данной работе мы описываем стратегию изготовления $T_{\text{рег}}$ КП в условиях надлежащей производственной практики путем комбинации процессов иммуномагнитной селекции $CD25^+$ -клеток на платформе CliniMACS plus (Miltenyi Biotec, Германия) из продукта афереза (ПА) и последующего сортинга $T_{\text{рег}}$ на основе проточной цитофлуориметрии на платформе MACSQuant Tyto (Miltenyi Biotec, Германия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании. Терапевтическое применение КП было одобрено индивидуальным решением врачебной комиссии в соответствии с клиническими показаниями пациентов.

Клеточные продукты

В работе приведена характеристика $T_{\text{рег}}$ КП ($n = 9$), произведенных в период с декабря 2021 г. по декабрь 2022 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В их число вошли данные 3 процессов, проведенных в рамках валидации протокола получения $T_{\text{рег}}$ КП

(обязательного этапа, предшествующего внедрению в клиническую практику), а также 6 $T_{\text{рег}}$ КП, в дальнейшем использованных в качестве клеточной терапии пациентов.

Пациенты

В исследование включены данные 6 пациентов, перенесших алло-ТГСК с процессингом трансплантата от гаплоидентичных доноров при помощи автоматизированной технологии TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплеции на платформе CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec, Германия). Все пациенты имели рефрактерную к терапии РТПХ (таблица 1). Медиана возраста пациентов на момент алло-ТГСК составляла 5 (2–12) лет, медиана срока от алло-ТГСК до клеточной терапии – 9,2 (4–14) мес.

Процедура получения клеточного продукта, обогащенного $T_{\text{рег}}$ -регуляторными клетками

Все $T_{\text{рег}}$ КП для пациентов были заготовлены от исходных доноров гемопоэтических стволовых клеток. Материал для изготовления $T_{\text{рег}}$ КП получали путем нестимулированного лейкофереза в соответствии с протоколом сбора мононуклеаров периферической крови с использованием прибора Spectra Optia, программное обеспечение версий 6 и 9 и Cobe Spectra, программное обеспечение версии 6.1 (Caridian BCT Inc, Lakewood, CO, США).

Процедура получения $T_{\text{рег}}$ КП из ПА состояла из 2 последовательных этапов:

1 – этап иммуномагнитной селекции $CD25^+$ -клеток с помощью прибора CliniMACS plus;

2 – сортинг $T_{\text{рег}}$ – этап сепарации $T_{\text{рег}}$ с помощью клеточного сортера MACSQuant Tyto на основании метода проточной цитометрии из фракции, полученной на предыдущем этапе. Схема процесса проиллюстрирована на рисунке 1.

Все этапы процедуры и формирования окончательного $T_{\text{рег}}$ КП проводились в соответствии с правилами надлежащей производственной практики в условиях чистых помещений.

Процесс иммуномагнитной селекции $CD25^+$ (этап 1)

ПА для подготовки к селекции последовательно инкубировали при температуре +4°C с биотинилированными флуоресцентными антителами к $CD25$ (GMP-CD25-PE-Biotin, Miltenyi Biotec, Германия) и магнитными антителами к биотину (GMP CliniMACS Anti-Biotin Reagent, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Далее выполняли магнитную сепарацию клеток на платформе CliniMACS Plus. В результате данного процессинга получали КП селекции, обогащенный $CD25^+$ -клетками ($CD25^+$ КП).

Таблица 1
Характеристика пациентов, включенных в исследование

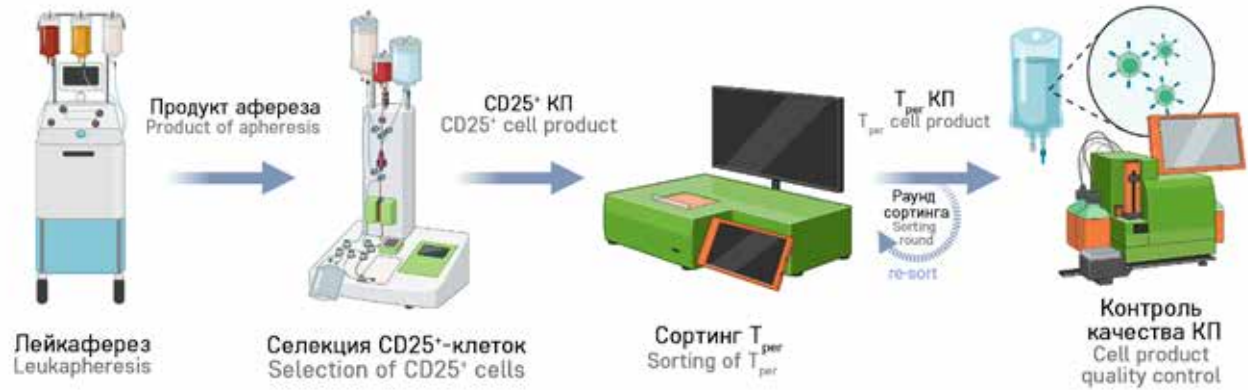
Tables 1
Patient characteristics

Пациент Patient	Инициальный диагноз Initial diagnosis	Возраст на момент алло-ТГСК, годы Age at allo-HSCT, years	РТПХ GVHD	Проявления РТПХ GVHD manifestation sites	Срок от алло-ТГСК до терапии T _{рег} , дни Time from allo-HSCT to CT, days	Доза T _{рег} /кг, E+05 T _{reg} dose/kg, E+05
P1	Миелодиспластический синдром с мутацией в гене <i>SAMD9</i> Myelodysplastic syndrome with <i>SAMD9</i> mutation	7	Хроническая Chronic	Кожа, кишечник Skin, intestine	126	5
P2	APDS-синдром с мутацией <i>PIK3D</i> APDS with <i>PIK3D</i> mutation	2	Хроническая Chronic	Кожа Skin	419	5
P3	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukaemia	3	Хроническая Chronic	Кожа, слизистые Skin, mucosae	133	5
P4	Острый лимфобластный лейкоз, BI Acute lymphoblastic leukaemia, BI	12	Хроническая Chronic	Кожа, желудочно-кишечный тракт Skin, gastrointestinal tract	406	2.5
P5	Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, дефицит аденозиндеаминазы Severe combined immune deficiency, adenosine deaminase deficiency	4	Хроническая Chronic	Кожа, кишечник, легкие Skin, intestine, lungs	169	5
P6	Нейробластома Neuroblastoma	6	Хроническая Chronic	Кожа Skin	384	5

Note. Allo-HSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; GVHD – graft-versus-host disease; CT – cell therapy; T_{рег} – regulatory T cells.

Рисунок 1
Схема процесса получения T_{рег} КП
Последовательно указаны основные этапы производства T_{рег} КП

Figure 1
Scheme of the process of obtaining T_{рег} cell products
The sequence of the main stages of T_{рег} cell product manufacturing



Процесс сортировки T-регуляторных клеток (этап 2)

Процесс сортировки T_{рег} выполняли из материала CD25⁺ КП при помощи клеточного сортера MACSQuant Tyto. Для осуществления сортировки CD25⁺ КП инкубировали с флуоресцентными моноклональными антителами GMP-CD4 VioBlue (Miltenyi Biotec, Германия) и GMP-CD127 APC (Miltenyi Biotec, Германия), далее материал помещали в стерильный одноразовый картридж MACS GMP Tyto Cartridge (Miltenyi Biotec, Германия), представляющий собой закрытую систему. Стратегия гейтирования для определения сортируемой популяции T_{рег}-лимфоцитов (рисунки 2) соответствовала ее поверхностному фенотипу CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}.

Учитывая специфику процесса, а именно ограничение картриджа по вместимости количества клеток и зависимость чистоты финальной фракции от скорости потока, материал CD25⁺ КП был разделен на несколько фракций для проведения последовательных сортировок. Для достижения более высокой клеточности финального продукта для части T_{рег} КП проводились повторные раунды сортировки.

Контроль качества клеточного продукта

Контроль качества, жизнеспособности и клеточного состава был произведен на всех этапах производства. Контрольными точками проведения исследований были выбраны ПА, CD25⁺ КП и финальный T_{рег} КП. Были утверждены следующие

Рисунок 2

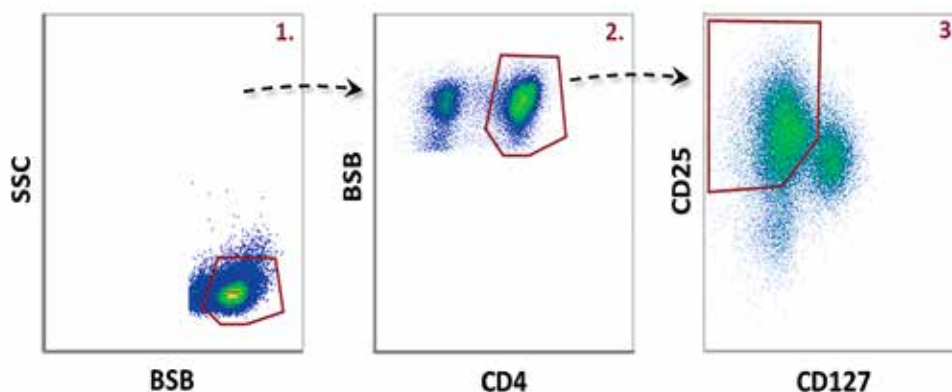
Стратегия последовательного гейтирования T_{reg} в процессе сортировки

1 – выделение популяции лейкоцитов от дебриса среди всех событий на основании параметров бокового светорассеяния (SSC) и обратного светорассеяния синего лазера (BSB); 2 – выделение региона Т-лимфоцитов среди всех лейкоцитов на основании положительной экспрессии маркера CD4; 3 – выделение региона T_{reg} в соответствии с фенотипом $CD25^{high}CD127^{low}$ среди $CD4^{+}$ Т-лимфоцитов. Данный регион является регионом сортировки

Figure 2

Sequential gating strategy for T_{reg} during the sorting process

1 – gating of the population of leukocytes from debris among all events based on the SSC (side scatter) and BSB (blue laser backscatter) parameters; 2 – identification of the $CD4^{+}$ T lymphocyte region among all leukocytes based on positive expression; 3 – identification of the T_{reg} region in accordance with the $CD25^{high}CD127^{low}$ phenotype among $CD4^{+}$ T lymphocytes. This region is designated as the sorting gate



параметры качества продукта, являющиеся критериями одобрения его дальнейшего терапевтического использования: микробиологическая безопасность продукта, жизнеспособность T_{reg} КП не менее 70% и содержание популяции T_{reg} в финальном продукте не менее 85%.

Оценка микробиологической безопасности включала отсутствие роста микроорганизмов (посев на стерильность (BD BACTEC, США)), отсутствие содержания эндотоксина (< 1 EU/mL) (Endosafe, LAL test, США) и отрицательный результат контаминации микоплазмой методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Евроген, Мусо Real-Time, Россия).

Жизнеспособность и содержание T_{reg} оценивали методом проточной цитометрии в рамках определения клеточного состава продуктов.

Оценка состава клеточных продуктов

Определение количества клеток и их жизнеспособности на всех этапах производства проводили с помощью проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). Подробный клеточный состав продуктов исследовали с помощью многоцветных панелей коммерческих моноклональных антител (таблица 2), данные были получены с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США) и проанализированы с использованием программного обеспечения CytExpert версии 2.3.0.84 (Beckman Coulter, США).

В данной работе для всех исследуемых популяций представлены значения медианы с указанием максимума и минимума разброса.

Оценку субпопуляций T_{reg} проводили по экспрессии маркеров CD45RA и CD197 (CCR7): наивные T_{reg} ($CD45RA^{+}CD197^{+}$), T_{reg} -лимфоциты центральной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{+}$), T_{reg} эффекторной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{-}$) и T_{eff} (TEMRA) ($CD45RA^{+}CD197^{-}$).

Содержание T_{reg} в финальном продукте определяли согласно протоколу внутриклеточного окрашивания транскрипционного фактора FoxP3 с использованием набора Human FoxP3 Buffer Set (Becton Dickinson, США) в соответствии с инструкцией производителя. Иллюстрация гейтирования T_{reg} на разных этапах производства представлена на рисунке 3.

Для T_{reg} КП (процесс 8) была проведена оценка статуса деметилирования CpG-островков в TSDR локуса FOXP3. ДНК образцов инкубировали без или в присутствии метилчувствительных рестриктаз: HpyCH4IV, AclI, HpaII, HinfI (New England BioLabs, Великобритания). Далее проводили очистку с помощью колонок (Cleanup Standard, Евроген, Россия). Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали реакционную смесь для ПЦР с красителем SYBR Green I (Евроген, Россия), праймеры на регион TSDR и контрольный ген XIST. Условия проведения ПЦР: 95°C 15 мин, 40 циклов 94,0°C 30 с, 65,0°C 30 с, 72,0°C 1 мин. Значения порогового цикла Ct были рассчитаны с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (BioRad, США). Амплификацию метилированных копий TSDR в образцах, обработанных рестриктазами, оценивали относительно амплификации контрольных, необработанных рестриктазами образцов с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Процент деметилирования рассчитывали как $100 -$ полученный процент метилирования.

Оценка функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов

Функциональная активность T_{reg} оценивалась на этапе валидации клинического протокола. $T_{эфф}$ для постановки исследований были получены методом

флуоресцентного сортинга $TCR\alpha\beta/CD45RO^{+}$ -клеток.

Оценка способности T_{reg} подавлять пролиферативную активность Т-лимфоцитов в ответ на алло-антигены в смешанной клеточной культуре была

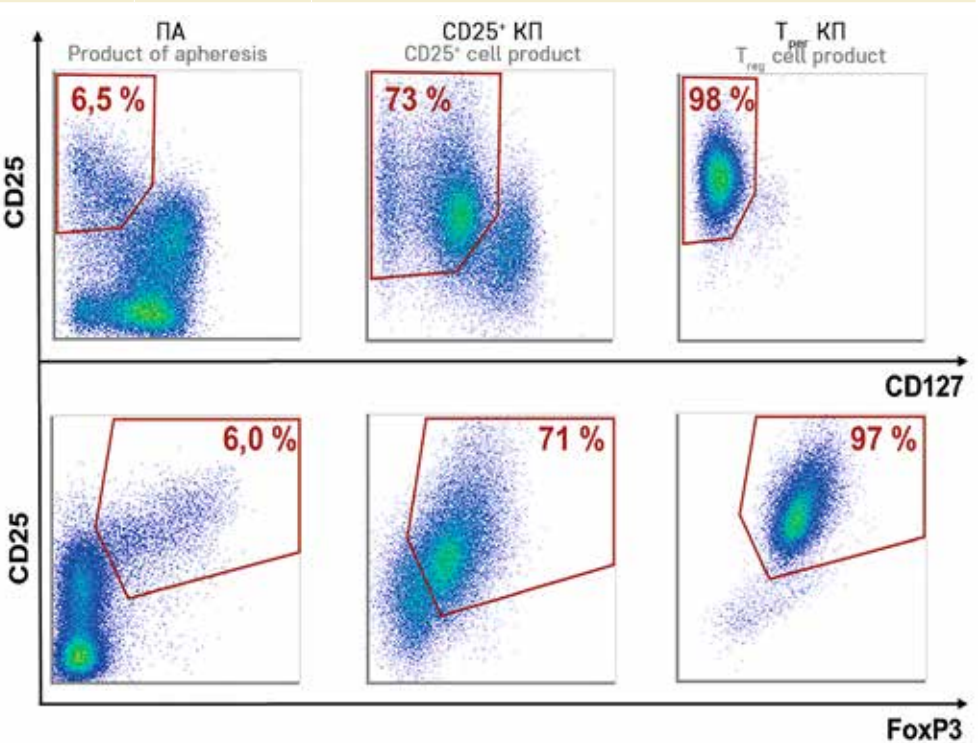
Таблица 2
Моноклональные антитела, используемые в многоцветных панелях для исследования клеточного состава продуктов с помощью проточной цитометрии

Tables 2
Monoclonal antibodies used in the multicolor panels for the study of the cellular composition of products by flow cytometry

Антитело Antibody	Производитель Manufacturer	Клон Clone	Клеточная популяция Cell population
CD45	Beckman Coulter, USA	J33	Лейкоциты Leukocytes
7-AAD	Miltenyi Biotec, Germany	-	Жизнеспособность Viability
CD3	Miltenyi Biotec, Germany	REA613	Т-лимфоциты T-lymphocytes
CD4	Miltenyi Biotec, Germany	M-T466	Т-хелперы T-helpers
FoxP3	Becton Dickinson, USA	236A/E7	T_{reg} T_{reg}
CD25	Miltenyi Biotec, Germany	REA570	T_{reg} T_{reg}
CD127	Miltenyi Biotec, Germany	MB15-18C9	T_{reg} T_{reg}
CD8	Becton Dickinson, USA	SK1	Т-цитотоксические клетки Cytotoxic T-cells
CD19	Miltenyi Biotec, Germany	J3-119	В-лимфоциты B-lymphocytes
CD56	Becton Dickinson, USA	NCAM16.2	НК-лимфоциты NK-lymphocytes
CD16	Beckman Coulter, USA	3G8	НК-лимфоциты/нейтрофилы NK-lymphocytes/neutrophils
TCRab	Miltenyi Biotec, Germany	BW242/412	$TCR\alpha\beta$ Т-лимфоциты $TCR\alpha\beta$ T-lymphocytes
TCRgd	Miltenyi Biotec, Germany	REA591	$TCR\gamma\delta$ Т-лимфоциты $TCR\gamma\delta$ T-lymphocytes
CD14	Miltenyi Biotec, Germany	RM052	Моноциты Monocytes
CD197	Miltenyi Biotec, Germany	REA108	Наивный фенотип/ фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T-lymphocytes phenotype
CD45RA	Miltenyi Biotec, Germany	T6D11	Наивный фенотип/ фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T-lymphocytes phenotype

Рисунок 3
Определение содержания T_{reg} в процессе производства T_{reg} КП с помощью проточной цитометрии
На дот-плотах отображена популяция $CD4^{+}$ Т-лимфоцитов соответствующих КП. Границы популяции T_{reg} отмечены красным. Процент T_{reg} указан среди $CD4^{+}$ Т-лимфоцитов

Figure 3
Determination of T_{reg} content in CP by flow cytometry
The dot plots show the population of $CD4^{+}$ T-lymphocytes in the corresponding CP. The boundaries of the T_{reg} population are marked in red. Numbers indicate the percentage of T_{reg} among $CD4^{+}$ T-lymphocytes



выполнена при помощи проточной цитометрии на основании оценки маркеров пролиферации. Кратко: $T_{\text{эфф}}$ после сортировки были смешаны в 3 соотношениях с $T_{\text{рег}}$ ($T_{\text{рег}}$ КП), далее к ним добавляли выделенную в градиенте плотности фракцию аллогенных мононуклеарных клеток (алло-МНК). Инкубацию проводили в течение 7 сут в среде TexMACS (Miltenyi Biotec, Германия), после чего оценивалась супрессорная активность $T_{\text{рег}}$ по 2 протоколам: исследование пролиферации с помощью протокола Click-iT EdU и определение внутриядерной экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Анализ репликации ДНК в пролиферирующих клетках проводили с использованием набора Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Реагент 5-этинил-2'-дезоксифуридин (EdU) добавляли в исследуемые лунки на 5-е сут инкубации. В процессе культивирования EdU встраивается в ДНК во время ее активного синтеза, что позволяет определить процентное содержание клеток в S-фазе клеточного цикла. После завершения культивирования выполняли фиксацию и пермеабиллизацию клеток образцов и их окрашивание реагентами из набора и антителами к поверхностным антигенам CD45, CD3 и маркером жизнеспособности 7-AAD.

Для оценки пролиферации методом определения экспрессии внутриядерного белка Ki-67 (Ki-67 REA183, Miltenyi Biotec, Германия) в финале культивирования образцы окрашивали согласно протоколу исследования внутриядерной/внутриклеточной экспрессии маркеров с использованием коммерческого набора Human FoxP3 Buffer Set (Becton Dickinson, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с исследовательским протоколом о применении биомедицинского КП, обогащенного

$T_{\text{рег}}$, перед его внедрением в клиническую практику необходимо было провести серию валидационных процессов изготовления КП, используя биоматериал условно здоровых доноров. После получения удовлетворительных результатов оценки качества и характеристики состава $T_{\text{рег}}$ КП предварительных процессов ($n = 3$) было принято решение о производстве клинических продуктов ($n = 6$). Далее представлены сводные данные по всем процессам.

Все произведенные $T_{\text{рег}}$ КП, включая продукты промежуточных этапов изготовления, отвечали заявленным параметрам микробиологической безопасности, имели высокие показатели жизнеспособности (медиана 99,1% (97–99,8%)) и были одобрены к применению в соответствии с установленными критериями контроля качества.

Медиана клеточности ПА, взятого в работу в качестве стартового материала для селекции CD25, составила $4E+09$ ($2E+09 - 6E+09$). Медиана содержания $T_{\text{рег}}$ в ПА – 2,4% (0,9–3,1%).

Полученные CD25⁺ КП были значительно обогащены $T_{\text{рег}}$, медиана их содержания составила 53% (34–77%). Медиана абсолютного количества $T_{\text{рег}}$ -лимфоцитов в CD25⁺ КП составила $2,6E+07$ ($1,9E+07 - 8,5E+07$). Также кроме $T_{\text{рег}}$ состав продукта селекции был представлен CD3⁺ Т-лимфоцитами (медиана 33,7% (9,4–52,7%)), среди которых большую часть составляли CD4⁺-лимфоциты (медиана 29,6% (7,1–48,3%)), и CD19 В-лимфоцитами (медиана 8,2% (2–21%)). Подробный клеточный состав представлен в таблице 3.

Среднее количество потребовавшихся раундов флуоресцентного сортировки $T_{\text{рег}}$ составило 5 (2–6). Состав $T_{\text{рег}}$ КП после сортировки был представлен в основном $T_{\text{рег}}$, медиана содержания экспрессирующих FoxP3 клеток составила 98% (91–99%). Кроме $T_{\text{рег}}$ состав продукта характеризовался незначи-

Таблица 3
Клеточный состав ПА и селекции CD25⁺

Tables 3
Cellular composition of apheresis products and CD25⁺ selection

Процесс Process	ПА Apheresis product			Продукт селекции CD25 ⁺ CD25 ⁺ selection product						
	Общая клеточность продукта, E+09 Total number of cells in the product, E+09	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % от всех клеток $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % of all cells	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06 $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06	Общая клеточность продукта, E+06 Total number of cells in the product, E+06	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % от всех клеток $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % of all cells	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06 $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06	Не- $T_{\text{рег}}$ -лимфоциты, % от всех клеток Not $T_{\text{рег}}$ lymphocytes, % of all cells			
							CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺
1	2,7	2,4	65	85	46	39	28	25	2,3	21,4
2	6,0	2	120	62	57,2	35	34	29	3,4	6,7
3	4,0	0,9	36	80	32,9	26	44	36	7,0	17,8
4	4,0	1,5	60	65	40	26	49	46	2,4	8,2
5	4,0	3,1	124	50	76,7	38	17	7	0,6	2,8
6	5,0	3,1	155	42	54	23	32	30	2,1	8,3
7	3,3	2,5	83	35	64,4	22	9	8	1,0	12,6
8	4,0	2,1	84	48	38,8	19	53	48	1,1	1,7
9	6,0	2,9	174	163	53	86	38	37	0,9	5,0

тельным количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов (медиана 1,8% (0,5–6,8%)) и практически полным отсутствием CD8⁺ Т-лимфоцитов (медиана 0,1% (0–0,2%)). Все Т-лимфоциты были представлены TCRαβ⁺-клетками (медиана 2% (0,5–6,5%)). Остальные субпопуляции лимфоцитов также детектировались лишь в небольших количествах: медиана содержания CD16⁺CD56⁺ NK-лимфоцитов 0,1% (0–0,2%), медиана

CD19⁺ В-лимфоцитов 0,1% (0–0,9%). Субпопуляционный состав T_{рег}-лимфоцитов был представлен фенотипом наивных клеток (медиана 26,5% (15,5–44,7%)), клеток центральной памяти (медиана 29% (11,0–42,4%)) и эффекторных клеток памяти (медиана 39,6% (24,5–63,0%)). Подробный клеточный состав T_{рег} КП представлен в таблице 4 и на рисунке 4. Относительное значение деметилирования

Таблица 4
Клеточный состав T_{рег} КП

Tables 4
Cellular composition of T_{рег} cell product

Про- цесс Pro- cess	Общая клеточ- ность продукта, Е+06 Total number of cells in the prod- uct, E+06	T _{рег} (FoxP3 ⁺), % от всех клеток T _{рег} (FoxP3 ⁺), % of all cells	T _{рег}				Не-T _{рег} -лимфоциты, % от всех клеток Not T _{рег} lymphocytes, % of all cells					Коли- чество раундов сортинга Number of sorting rounds	Выход со- ртинга, % Sorting yield, %
			Наи- вные, % Naïve, %	CM, %	EM, %	TEMRA, %	CD4 ⁺	TCRαβ	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD56 ⁺		
1	20	98	39	26	34	2	1,4	1,5	0,1	0,5	0,1	4	63
2	10	99	45	29	25	2	0,5	0,5	0	0,2	0	5	55
3	14,5	98	37	29	32	2	1,9	2,1	0,2	0,9	0	5	74
4	18,7	91	22	36	45	0	6,8	6,5	0,1	0	0	3	72
5	5	95	16	42	41	2	3,6	3,6	0	0	0	2	69
6	15,5	98	30	33	35	2	0,8	0,8	0	0	0	5	44
7	18	98	19	26	53	2	0,7	0,7	0,1	0,2	0	5	79
8	20	95	27	30	40	4	1,8	2,0	0,2	0,0	0,2	6	57
9	55	94	25	11	63	1	4,8	5,0	0,2	0,1	0	6	64

Примечание. Наивные – T_{рег} с фенотипом CD45RA⁺CD197⁺; CM – T_{рег} с фенотипом центральных клеток памяти, CD45RA⁺CD197⁺; EM – T_{рег} с фенотипом эффекторных клеток памяти, CD45RA⁺CD197⁺; TEMRA – T_{рег} с фенотипом эффекторных клеток CD45RA⁺, CD45RA⁺CD197⁺. Выход сортинга рассчитан как отношение количества T_{рег} в финальной фракции сортинга к количеству T_{рег} в КП селекции CD25⁺.

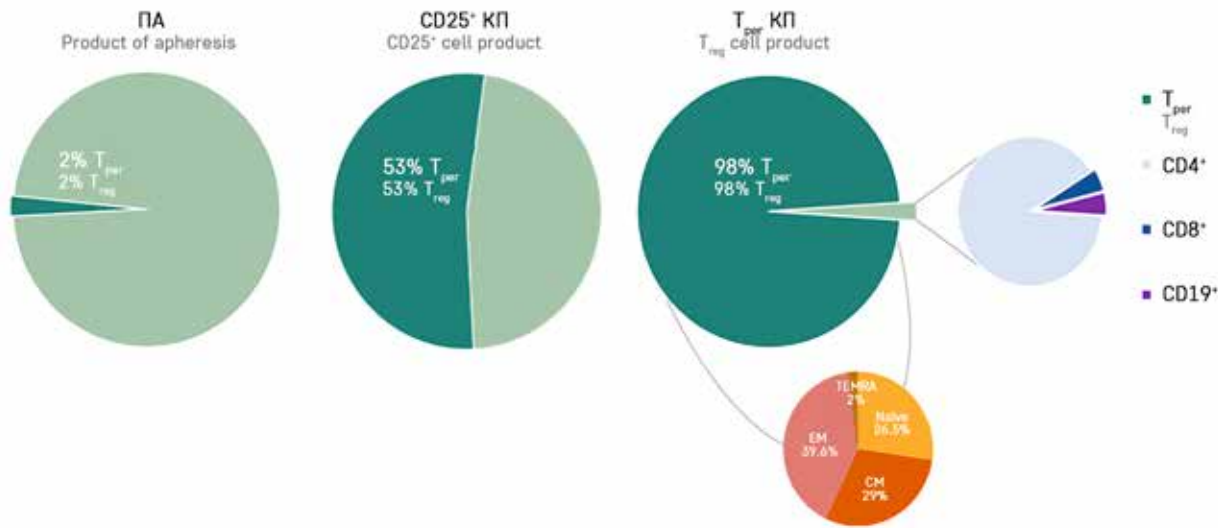
Note. Naïve T_{рег} – CD45RA⁺CD197⁺; CM – T_{рег} with central memory cell phenotype, CD45RA⁺CD197⁺; EM – T_{рег} with effector memory phenotype, CD45RA⁺CD197⁺; TEMRA – T_{рег} with effector memory phenotype, CD45RA⁺CD197⁺. The sorting yield is calculated as the ratio of the amount of T_{рег} in the final sorting fraction to the amount of T_{рег} in the cell product of CD25⁺ selection.

Рисунок 4
Содержание T_{рег} в КП

На диаграммах указаны медианы процентного содержания T_{рег} от общего числа клеток в ПА, CD25⁺ КП и T_{рег} КП. Диаграмма состава T_{рег} КП содержит 2 дочерние диаграммы: субпопуляционный состав лимфоцитов в продукте (фракция не-T_{рег}) (справа), субпопуляционный состав T_{рег} (внизу)

Figure 4
T_{рег} content in cell products

The diagrams show the median percentage of T_{рег} cells of the total number of cells in apheresis products, CD25⁺ cell products and T_{рег} cell products. The diagram of the T_{рег} cell product composition contains two secondary diagrams: the subpopulation composition of lymphocytes in the product (fraction of non-T_{рег} cells) (right), the subpopulation composition of T_{рег} cells (bottom)



геномного участка TSDR, исследованное для КП 8, составило 52%.

Все 6 пациентов удовлетворительно перенесли инфузию $T_{\text{рег}}$ КП, не было зафиксировано побочных эффектов (ухудшение РТПХ, проявление цитокинового шторма или нейротоксичности). Доза инфузии составила $5E+05$ клеток/кг для 5 пациентов и $2,5E+05$ клеток/кг – для 1.

В дополнение к вышесказанному нами была продемонстрирована супрессорная *in vitro* активность $T_{\text{рег}}$ при исследовании их функциональных особенностей в реакции смешанной культуры в присутствии аллоспецифичных Т-лимфоцитов на валидационном этапе протокола (рисунок 5). Полученные в соответствии с описанным протоколом $T_{\text{рег}}$ способны подавлять пролиферацию $T_{\text{эфф}}$ -лимфоцитов, активированную в ответ на присутствие аллогенных клеток, что отражено в снижении экспрессии $T_{\text{эфф}}$ клетками маркеров пролиферации Ki-67 и EdU.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современный подход к лечению и профилактике РТПХ обычно включает комбинированное применение фармакологических препаратов в целях ограничения иммунного ответа при сохранении эффекта «трансплантат против лейкоза». Основными являются стратегии, включающие использование кортикостероидов, ингибиторов кальциневрина и антитимоцитарного глобулина для подавления активации и пролиферации аллоспецифичных Т-лимфоцитов [30, 31]. Однако, несмотря на высокую эффективность фармацевтических подходов к контролю РТПХ, поиск новых методов лечения, включая использование адоптивных клеточных технологий, остается актуальной задачей.

Методы, направленные на селекцию $T_{\text{рег}}$ и прямое их применение, а также на культивацию в целях увеличения количества $T_{\text{рег}}$ и усиления их супрессорной функции, представляют собой наиболее актуальную альтернативу современным фармакологическим подходам, основанным во многом на неспецифической иммуносупрессии. Многочисленные доклинические модели продемонстрировали значительный потенциал $T_{\text{рег}}$ для лечения множества патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания [32, 33], РТПХ [34] и индукцию толерантности в трансплантации органов [35].

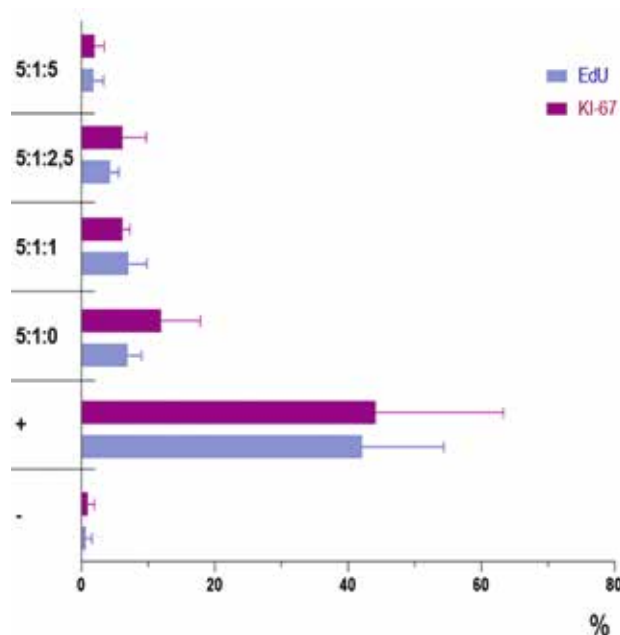
В настоящее время наиболее распространенным подходом является введение пациентам размноженных посредством культивирования *ex vivo* $T_{\text{рег}}$ КП [36, 37]. Процесс культивации обеспечивает доступность дополнительных манипуляций с КП, таких как антиген-направленная модификация, применяемая при ряде аутоиммунных состояний, а также позво-

Рисунок 5

Исследование способности $T_{\text{рег}}$ подавлять пролиферативную активность Т-лимфоцитов в ответ на аллоантигены в клеточной культуре с помощью протоколов оценки Click-i Plus EdU и Ki-67 ($T_{\text{эфф}}$:алло-МНК: $T_{\text{рег}}$). На графике указаны медианы процентного содержания Ki-67 и EdU в популяции $T_{\text{эфф}}$ ($n = 6$). «—» – отрицательный контроль (нестимулированные $T_{\text{эфф}}$); «+» – положительный контроль (активированные $T_{\text{эфф}}$)

Figure 5

An investigation of the ability of $T_{\text{рег}}$ cells to suppress the proliferative activity of T-lymphocytes in response to alloantigens in cell culture using the Click-iPlus EdU and Ki-67 assessment protocols ($T_{\text{эфф}}$:allo-MNC: $T_{\text{рег}}$). The graph shows the median percentages of Ki-67 and EdU in the population of T-effector cells ($n = 6$). “—” negative control (unstimulated $T_{\text{эфф}}$); “+” – positive control (activated $T_{\text{эфф}}$). Allo-MNC – allogeneic mononuclear cells



ляет достичь более высоких терапевтических доз, что является несомненным преимуществом такого подхода. Однако проблемой существующих протоколов культивации $T_{\text{рег}}$ является необходимость контроля клеточного состава конечного продукта, в частности уровней контаминации $T_{\text{эфф}}$ -популяциями, а также стабильности экспрессии FoxP3 при длительной культивации. Также нельзя не учитывать, что процесс культивации клеток ведет к усложнению соблюдения асептических условий в связи с увеличением рисков контаминации.

Преимуществом $T_{\text{рег}}$ КП, произведенных без использования культивации, является возможность точного контроля клеточного состава. Хотя такие протоколы и уступают в количественной составляющей КП стратегиям с культивацией, терапевтическая доза для них является достижимой. Согласно клиническим исследованиям ранней фазы, не существует единого мнения о терапевтической дозе $T_{\text{рег}}$, необходимой для лечения или профилактики РТПХ, и она может варьировать от $1E+05$ до $1E+08$ клеток/кг массы реципиента в зависимости от состояния

конкретного пациента и тяжести РТПХ [14, 22–24, 27]. Комбинация предложенного нами алгоритма последовательной иммуномагнитной селекции CD25⁺ и последующего клеточного сортирования позволила получить КП с их дальнейшей имплементацией в существующие клинические протоколы лечения РТПХ.

Все КП одобрены к клиническому применению в соответствии с критериями контроля качества и микробиологической безопасности и в дальнейшем были использованы в качестве терапии РТПХ у 6 пациентов по жизненным показаниям. Согласно оценке клеточного состава все произведенные T_{рег} КП были представлены жизнеспособными T_{рег}-лимфоцитами с фенотипом CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CD127^{low} (медиана содержания T_{рег} 98%).

Важным аспектом при производстве КП в целях терапии РТПХ является отсутствие примеси алло-специфичных Т-лимфоцитов, способных развить или усугубить ее течение. При оценке полученных нами T_{рег} КП популяция CD4⁺ Т-лимфоцитов была представлена в незначительном количестве (~2%), остальные клеточные популяции практически полностью отсутствовали (~0,1%).

В настоящий момент известно, что после получения активационного сигнала Т-лимфоциты, не являющиеся T_{рег}, также способны экспрессировать фактор FoxP3, однако экспрессия имеет транзиторный характер и меньшую концентрацию внутри клетки [38, 39]. Экспрессия FoxP3 фактора временно позволяет Т-лимфоцитам снизить чувствительность к проапоптотическому механизму, отвечающему за клеточную гибель, индуцированную рестимуляцией Т-клеточного рецептора (restimulation-induced cell death) [40]. В связи с этим использование данных только об экспрессии FoxP3 может быть недостаточным для однозначной характеристики КП. Детальная оценка субпопуляционного состава T_{рег}, а также оценка статуса метилирования участка TSDR являются важными дополнительными характеристиками.

В полученных КП около четверти (26%) популяции T_{рег}-лимфоцитов имели наивный фенотип CD45RA⁺CD197⁺, ассоциированный с тимическими T_{рег}-лимфоцитами. В ряде работ была продемонстрирована связь экспрессии вышеупомянутых маркеров среди T_{рег} и деметилирования локуса TSDR, а также характерных для T_{рег} функциональных особенностей [19, 41]. К сожалению, в нашем исследовании изучение TSDR было выполнено лишь для одного из КП. Результаты наших исследований на этапе доклинической разработки в совокупности с результатом образца из данного исследования также подтверждают наличие корреляции между методом определения деметилированного статуса TSDR и оценкой

экспрессии FoxP3 с помощью проточной цитометрии (данные готовятся к публикации).

Со стороны технической составляющей процесса изготовления КП необходимо отметить, что в сравнении со стандартной процедурой афереза, например, в целях проведения алло-ТГСК, занимающей порядка 5–6 ч и при которой необходимо собрать около 40–60E+09 клеток, для производства T_{рег} КП требуется относительно небольшое стартовое число клеток. Так, медиана содержания тотального количества лейкоцитов в ПА составила 4E+09, длительность лейкофереза – 60–90 мин. Сокращение времени сбора ПА является более комфортным и безопасным для донора, а также может являться существенным преимуществом при работе с сиблингами, имеющими низкую массу тела.

Процедура сортирования из CD25⁺ КП в зависимости от содержания T_{рег} позволяет получить около 3 млн T_{рег} за 1 раунд с медианой чистоты популяции более 91% в конечном продукте. В зависимости от требуемой терапевтической дозы клеток в расчете на 1 кг массы тела реципиента требовалось от 2 до 6 раундов сортирования. Количество полученных Т-лимфоцитов не только соответствовало выбранному нами целевому значению, но и позволило провести криоконсервацию дополнительных доз для повторных введений продукта.

Эффективность клинического применения T_{рег} и их функциональность в отношении разрешения процесса РТПХ продолжает оставаться предметом активных исследований. Так, в работе C.S. Bader и соавт. [42] было показано, что моноиспользование T_{рег}-терапии без какого-либо дополнительного иммуносупрессивного сопровождения у пациентов после ТГСК недостаточно для предотвращения острой РТПХ. Ввиду этого появляются работы, нацеленные на усовершенствование T_{рег} КП с помощью генетической модификации, например снижения чувствительности к иммуносупрессивным препаратам, таким как ингибиторы кальциневрина [43, 44]. Другой подход основан на использовании низких доз интерлейкина-2 у пациентов с хронической формой РТПХ в качестве улучшающего функциональную активность T_{рег} *in vivo* фактора. Этот подход показал эффективность в лечении стероидорезистентных форм РТПХ, однако ввиду малочисленности дополнительных клинических исследований он также остается предметом дискуссии [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, нами был разработан и успешно внедрен протокол клинического производства T_{рег} КП для лечения РТПХ у пациентов, получивших ТГСК. В дальнейшем нами

планируется изучение клинической эффективности примененной терапии, а также оценка возможности использования данного протокола в качестве базового для производства генетически модифицированных КП, позволяющих расширить показания использования данного вида клеточной терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Sozonova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0057-2727>
Malakhova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7334-0706>
Kulakovskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2779>
Lodoeva O.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2874-0014>
Musaeva E.Ya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0581-9472>
Muzalevskii Ya.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-8299>
Kazachenok A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0497-9175>
Osipova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9968-9332>
Badrin E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8678-9705>
Belchikov V.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7491-6906>
Melkova A.K. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3801-0931>
Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>
Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература / References

- MacDonald K.P.A., Hill G.R., Blazar B.R. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 2017; 129: 13–21. DOI: 10.1182/blood-2016-06-686618
- Martin P.J., Counts G.W., Appelbaum F.R., Lee S.J., Sanders J.E., Deeg H.J., et al. Life Expectancy in Patients Surviving More Than 5 Years After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1011–6. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6693
- Wingard J.R., Majhail N.S., Brazauskas R., Wang Z., Sobocinski K.A., Jacobsohn D., et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2230–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.7212
- Ferrara J.L., Levine J.E., Reddy P., Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550–61. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3
- Magenau J., Runaas L., Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2016; 173: 190–205. DOI: 10.1111/bjh.13959
- Ikegawa S., Matsuoka K. Harnessing T_{reg} Homeostasis to Optimize Posttransplant Immunity: Current Concepts and Future Perspectives. *Front Immunol* 2021; 12: 713358. DOI: 10.3389/fimmu.2021.713358
- Guo W., Su X., Wang M., Han M., Feng X., Jiang E. Regulatory T Cells in GVHD Therapy. *Front Immunol* 2021; 12: 697854. DOI: 10.3389/fimmu.2021.697854
- Del Papa B., Ruggeri L., Urbani E., Baldoni S., Cecchini D., Zei T., et al. Clinical-Grade-Expanded Regulatory T Cells Prevent Graft-versus-Host Disease While Allowing a Powerful T Cell-Dependent Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23: 1847–51. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.07.009
- Taylor P.A., Noelle R.J., Blazar B.R. Cd4⁺Cd25⁺ Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. *J Exp Med* 2001; 193: 1311–8. DOI: 10.1084/jem.193.11.1311
- Hara M., Kingsley C.I., Niimi M., Read S., Turvey S.E., Bushell A.R., et al. IL-10 Is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigens In Vivo. *J Immunol* 2001; 166: 3789–96. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3789
- Lederer K., Maillard I. New mechanisms of GVHD suppression by T_{reg}s. *Blood* 2023; 141: 1655–7. DOI: 10.1182/blood.2022019396
- Wood K.J., Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210. DOI: 10.1038/nri1027
- Taylor P.A., Lees C.J., Blazar B.R. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493–9. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3493
- Hippen K.L., Merkel S.C., Schirm D.K., Nelson C., Tennis N.C., Riley J.L., et al. Generation and Large-Scale Expansion of Human Inducible Regulatory T Cells That Suppress Graft-Versus-Host Disease. *Am J Transplant* 2011; 11: 1148–57. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–64.
- Shevryev D., Tereshchenko V. T_{reg} Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol* 2020; 10: 3100. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03100
- Polansky J.K., Kretschmer K., Freyer J., Floess S., Garbe A., Baron U., et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1654–63. DOI: 10.1002/eji.200838105
- Lal G., Zhang N., van der Touw W., Ding Y., Ju W., Bottinger E.P., et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* 2009; 182 (1): 259–73. DOI: 10.4049/jimmunol.182.1.259
- Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899–911. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
- Gratz I.K., Rosenblum M.D., Maurano M.M., Paw J.S., Truong H.-A., Marshak-Rothstein A., et al. Cutting Edge: Self-Antigen Controls the Balance between Effector and Regulatory T Cells in Peripheral Tissues. *J Immunol* 2014; 192: 1351–5. DOI: 10.4049/jimmunol.1301777
- Rosenblum M.D., Way S.S., Abbas A.K. Regulatory T cell mem-

- ory. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 90–101. DOI: 10.1038/nri.2015.1
22. Trzonkowski P., Bieniaszewska M., Juścińska J., Dobyszek A., Krzystyniak A., Marek N., et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human *ex vivo* expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T regulatory cells. *Clin Immunol* 2009; 133: 22–6. DOI: 10.1016/j.clim.2009.06.001
 23. Landwehr-Kenzel S., Müller-Jensen L., Kuehl J.-S., Abou-el-Enein M., Hoffmann H., Muench S., et al. Adoptive transfer of *ex vivo* expanded regulatory T cells improves immune cell engraftment and therapy-refractory chronic GVHD. *Mol Ther* 2022; 30: 2298–314. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.02.025
 24. Amini L., Kaeda J., Fritsche E., Roemhild A., Kaiser D., Reinke P. Clinical adoptive regulatory T Cell therapy: State of the art, challenges, and prospective. *Front Cell Dev Biol* 2023; 10: 1081644. DOI: 10.3389/fcell.2022.1081644
 25. MacMillan M.L., Hippen K.L., McKenna D.H., Kadidlo D., Sumstad D., DeFor T.E. First-in-human phase 1 trial of induced regulatory T cells for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA-matched siblings. *Blood Adv* 2021; 5 (5): 1425–36. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003219
 26. Beres A.J., Drobycki W.R. The Role of Regulatory T Cells in the Biology of Graft Versus Host Disease. *Front Immunol* 2013; 4: 163. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00163
 27. MacDonald K.N., Piret J.M., Levings M.K. Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy. *Clin Exp Immunol* 2019; 197: 52–63. DOI: 10.1111/cei.13297
 28. Irvine D.J., Maus M.V., Mooney D.J., Wong W.W. The Future of Engineered Immune Cell Therapies. *Science* 2022; 378: 853–8. DOI: 10.1126/science.abq6990
 29. Jarvis L.B., Rainbow D.B., Coppard V., Howlett S.K., Georgieva Z., Davies J.L., et al. Therapeutically expanded human regulatory T-cells are super-suppressive due to HIF1A induced expression of CD73. *Commun Biol* 2021; 4: 1186. DOI: 10.1038/s42003-021-02721-x
 30. Puckrin R., Chi Fung Kwan A., Blosser N., Leyshon C., Duggan P., Daly A. Corticosteroids as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic cell transplant recipients with calcineurin inhibitor intolerance. *Cytotherapy* 2023; 25 (10): 1101–6. DOI: 10.1016/j.jcyt.2023.05.010
 31. Goptu M., Antin J.H. GVHD Prophylaxis 2020. *Front Immunol* 2021; 12: 605726. DOI: 10.3389/fimmu.2021.605726
 32. Peters J.H., Preijers F.W., Woestenink R., Hilbrands L.B., Koenen H.J.P.M., Joosten I. Clinical Grade T_{reg}: GMP Isolation, Improvement of Purity by CD127pos Depletion, T_{reg} Expansion, and T_{reg} Cryopreservation. *PLoS One* 2008; 3 (9): e3161. DOI: 10.1371/journal.pone.0003161
 33. Seay H.R., Putnam A.L., Cserny J., Posgai A.L., Rosenau E.H., Wingard J.R., et al. Expansion of Human T_{regs} from Cryopreserved Umbilical Cord Blood for GMP-Compliant Autologous Adoptive Cell Transfer Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017; 4: 178–91. DOI: 10.1016/j.omtm.2016.12.003
 34. Doglio M., Crossland R.E., Alho A.C., Penack O., Dickinson A.M., Stary G., et al. Cell-based therapy in prophylaxis and treatment of chronic graft-versus-host disease. *Front Immunol* 2022; 13: 1045168. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1045168
 35. Chandran S., Tang Q., Sarwal M., Laszik Z.G., Putnam A.L., Lee K., et al. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am J Transplant* 2017; 17: 2945–54. DOI: 10.1111/ajt.14415
 36. Di Ianni M., Falzetti F., Carotti A., Terenzi A., Castellino F., Bonifacio E. T_{regs} prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011; 117 (14): 3921–8. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311894
 37. Edinger M., Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 679–84. DOI: 10.1016/j.coi.2011.06.006
 38. Gavin M.A., Torgerson T.R., Houston E., DeRoos P., Ho W.Y., Stray-Pedersen A., et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (17): 6659–64. DOI: 10.1073/pnas.0509484103
 39. Roncador G., Brown P.J., Maestre L., Hue S., Martínez-Torrecuadrada J.L., Ling K.-L., et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35 (6): 1681–91. DOI: 10.1002/eji.200526189
 40. Voss K., Lake C., Luthers C.R., Lott N.M., Dorjbal B., Arjunaraja S., et al. FOXP3 protects conventional human T cells from premature restimulation-induced cell death. *Cell Mol Immunol* 2021; 18 (1): 194–205. DOI: 10.1038/s41423-019-0316-z
 41. Hoffmann P., Eder R., Boeld T.J., Doser K., Piseshka B., Andreesen R., Edinger M. Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon *in vitro* expansion. *Blood* 2006; 108 (13): 4260–7. DOI: 10.1182/blood-2006-06-027409
 42. Bader C.S., Pavlova A., Lowsky R., Muffy L.S., Shiraz P., Arai S., et al. Single-center randomized trial of T-reg graft alone vs T-reg graft plus tacrolimus for the prevention of acute GVHD. *Blood Adv* 2024; 8: 1105–15. DOI: 10.1182/bloodadvances.2023011625
 43. Amini L., Wagner D.L., Rössler U., Zarrinrad G., Wagner L.F., Vollmer T., et al. CRISPR-Cas9-Edited Tacrolimus-Resistant Antiviral T Cells for Advanced Adoptive Immunotherapy in Transplant Recipients. *Mol Ther* 2021; 29: 32–46. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.011
 44. Peter L., Wendering D.J., Schlickeiser S., Hoffmann H., Noster R., Wagner D.L., et al. Tacrolimus-resistant SARS-CoV-2-specific T cell products to prevent and treat severe COVID-19 in immunosuppressed patients. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2022; 25: 52–73. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.02.012
 45. Koreth J., Matsuoka K.-ichi, Kim H.T., McDonough S.M., Bindra B., Alyea E.P. 3rd, et al. Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 2011; 365 (22): 2055–66. DOI: 10.1056/NEJMoa1108188