

ТЕСТИРОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К Т-КЛЕТОЧНОМУ РЕЦЕПТОРУ, АССОЦИИРОВАННОМУ С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ

М. А. Израэльсон^{1,3}, А. В. Степанов², Д. Б. Староверов^{1,3}, И. А. Шагина¹, А. К. Мисорин⁴, М. А. Щемелева⁴, А. В. Евстратьева⁴, Е. М. Мерзляк^{1,3}, Е. А. Богданова¹, О. В. Британова³✉, С. А. Лукьянов¹

¹ Отдел молекулярных технологий, Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Отдел пептидно-белковых технологий, Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва

³ Отдел геномики адаптивного иммунитета, Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва

⁴ BIOCAD, Санкт-Петербург

В последние десятилетия в лечении аутоиммунных заболеваний прослеживается тенденция к замещению симптоматической на молекулярно-таргетную терапию. Предпосылками для этого служат как установленные механизмы развития заболевания, так и прогресс в области биотехнологии. Недавно было показано, что Т-клеточные рецепторы, содержащие варибельные участки β-цепи TRBV9, ассоциированы со спондилоартропатиями, включая анкилозирующий спондилит. Целью данной работы было получение, определение специфичности и оценка цитотоксичности химерного моноклонального антитела, взаимодействующего с варибельным участком β-цепи Т-клеточного рецептора, который кодируется генным сегментом TRBV9. С помощью цитометрического анализа, а также массированного секвенирования показано, что химерное антитело обладает высокой специфичностью и цитотоксической активностью. Получение лечебного антитела к потенциально патогенному Т-клону может быть перспективным подходом для терапии аутоиммунных заболеваний в целом и АС в частности.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, анкилозирующий спондилит, терапевтические антитела, лечение аутоиммунных заболеваний, Т-клеточный рецептор

Финансирование: работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI60716X0158.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Владимировна Британова
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; olbritan@gmail.com

Статья получена: 13.09.2018 **Статья принята к печати:** 11.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.064

TESTING OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE T-CELL RECEPTOR ASSOCIATED WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Israelson MA^{1,3}, Stepanov AV², Staroverov DB^{1,3}, Shagina IA¹, Misorin AK⁴, Schemeleva MA⁴, Evstratieva AV⁴, Merzlyak EM^{1,3}, Bogdanova EA¹, Britanova OV³ ✉, Lukyanov SA¹

¹ Department of Molecular Technologies, Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Department of Peptide and Protein Technologies, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow

³ Department of Adaptive Immunity Genomics, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow

⁴ BIOCAD, Saint-Petersburg

In the last decade there has been a tendency to move away from the symptomatic treatment and embrace targeted therapies. This process is underpinned by the accumulated knowledge of the mechanisms underlying the pathogenesis of diseases and driven by the advances in biotechnologies. T-cell receptors with variable TRBV9 β-chain regions have been recently associated with spondyloarthritis including its subtype, ankylosing spondylitis. The aim of this work was to engineer a chimeric monoclonal antibody targeting the variable region of the T-cell receptor β-chain encoded by the TRBV9 gene segment and assess its specificity and cytotoxicity. Using flow cytometry and next generation sequencing, we demonstrate that the engineered chimeric antibody is highly specific and exhibits cytotoxic activity against its target. Approaches based on the use of therapeutic chimeric antibodies against pathogenic T-clones may hold great promise for the therapy of autoimmune disorders in general and AS in particular.

Keywords: autoimmune disease, ankylosing spondylitis, therapeutic antibody for autoimmunity treatment, T-cell receptor

Funding: this work was supported by the Ministry of Science and Education of the Russian Federation, Project ID RFMEFI60716X0158.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Britanova
Miklouho-Maclay 16/10, Moscow, 117997; olbritan@gmail.com

Received: 13.09.2018 **Accepted:** 11.10.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.064

Анкилозирующий спондилит (АС, или болезнь Бехтерева) — это хроническое, прогрессирующее аутоиммунное заболевание, сцепленное с HLA B2705, проявляющееся в преимущественном воспалении суставов позвоночника и крестцово-подвздошного сочленения, что влечет за собой ограничение их подвижности вплоть до образования костных сращений, т. е. анкилоза. Основные очаги воспаления локализируются в межпозвоночных суставах, а также в реберно-позвоночных и крестцово-подвздошных сочленениях. Для лечения применяют препараты, способствующие остановке воспалительных процессов. Например, назначают физиотерапию и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС), такие как ибупрофен, диклофенак, индометацин. Крайне мало известно о применении стероидных препаратов для лечения АС. Показано, что прием преднизолона в высокой дозе (50 мг/день) в течение двух недель значительно снижает симптомы заболевания в краткосрочной перспективе [1]. Описан долгосрочный эффект глюкокортикоидов, которые вводили внутривенно в высокой дозе [2]. Наблюдалось снижение симптомов заболевания, сохранявшееся в течение года после введения лекарства, а также побочное действие препарата: повышение артериального давления, уровня сахара в крови и снижение минерализации костей. Пациентам с тяжелыми формами АС назначают фенилбутазон и опиоиды для снижения болевых ощущений. Применяемые схемы лечения позволяют частично снять симптоматический комплекс, но не останавливают развитие заболевания, в том числе вероятность формирования анкилоза, и вызывают значительные побочные эффекты, например со стороны желудочно-кишечного тракта [3].

В последние 15 лет существенным прогрессом в терапии АС стало применение биологических блокаторов фактора некроза опухоли альфа (ФНО), таких как *infliximab*, *adalimumab*, *golimumab* и *certolizumab pegol* (моноклональные антитела к ФНО). ФНО является основным индуктором воспаления, который вовлечен в развитие и многих других аутоиммунных заболеваний [4]. С 2010 г. блокаторы ФНО вошли в перечень видов терапии пациентов с АС, рекомендованных международным обществом экспертов в области спондилоартритов (ASAS) [5]. Так, использование *infliximab* (моноклонального антитела к ФНО) приводит к супрессии спинального воспаления и как результат к снижению боли и скованности [6]. Опыт применения препаратов показал, что только у 50–60% пациентов, страдающих АС, наблюдается положительный эффект связанный с анти-ФНО терапией [7]. Однако стоит отметить, что ингибирование ФНО или его рецептора хотя и приводит к снижению воспаления, не тормозит развитие заболевания в целом [8, 9].

Известно, что при аутоиммунных заболеваниях растет количество продуцируемого IL17. Ранее было показано, что в суперпродукцию IL17 вовлечено несколько типов клеток: CD4⁺T_H, гамма/дельта и KIR3DL2-экспрессирующих Т-клеток. В 2013 г. была опубликована работа по использованию моноклонального антитела против IL17 (*secukinumab*) для снижения выраженности симптоматики, сопровождающей АС. Применение этого препарата значительно снизило клинические проявления АС в острой фазе [10, 11].

На стадии клинических исследований препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний, в том числе и АС, находятся моноклональные антитела к рецепторным

комплексам CD3 и CD4, обладающие иммуномодулирующими свойствами [12–14]. На сегодняшний день подтверждено как на животных моделях, так и на группах пациентов, страдающих ревматоидным артритом, что применение данных препаратов вызывает снижение уровня провоспалительных факторов, а также увеличение уровня супрессорных факторов (IL10, TGFβ) [14, 15]. В то же время применение анти-CD3-антител стимулирует не только Т-регуляторные клетки, но и другие Т-клеточные субпопуляции, а также может вызывать массивный апоптоз среди Т-лимфоцитов [16]. Кажется очевидным, что выведение из организма значительной субпопуляции Т-лимфоцитов крайне травматично для иммунной системы в целом и приведет к снижению иммунитета, увеличению риска возникновения как инфекционных, так и онкологических заболеваний. Показано также, что применение такого подхода влечет за собой риск появления вторичных аутоиммунных заболеваний.

Узнавание антигена Т-клетками происходит за счет Т-клеточного рецептора (ТКР), состоящего из двух полипептидных цепей (α и β). При формировании цепей в ходе негомологичной рекомбинации происходит сближение V-, D- и J-сегментов, а на стыке сегментов терминальная трансфераза добавляет случайные нуклеотиды, которые обуславливают появление уникальных вариабельных участков (CDR). Именно за счет этих процессов формируется разнообразие ТКР.

Согласно номенклатуре IMGT среди β-цепей ТКР человека выделяют 26 различных вариабельных сегментов, а для α-цепи 41 сегмент [17]. В норме после прохождения позитивной и негативной селекции в тимусе обладающие аутоиммунной активностью Т-клетки элиминируются. Несмотря на это описано множество заболеваний, связанных с аутореактивностью Т-клеток.

Один из обсуждаемых в литературе подходов — использование антитела, которое узнает все α- и β-ТКР. Такой подход был описан в одной из работ [18], где показано, что одновременное введение антитела и индуктора (миелинового пептида MOG35-55) полностью блокировало развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ). При этом наблюдалась ожидаемая деплеция CD4⁺- и CD8⁺-клеток. Однако эти популяции Т-клеток вели себя по-разному: первыми исчезали CD4⁺ и они же первыми восстанавливались, тогда как CD8⁺, наоборот, позже исчезали и позже восстанавливались. Авторы также отметили тот факт, что эффект такой терапии был постоянным, т. е. не наблюдалось проявления заболевания даже после полного восстановления Т-клеточной популяции, в отличие от терапии антителами против CD3. Несмотря на то что оба вида терапии направлены на деплецию Т-клеток, механизмы, которые активируются внутри клеток за счет формирования двойственного комплекса ТКР и CD3 с антителами, разные и приводят к различным эффектам. Использование моноклональных антител против вариабельных доменов, характерных для аутореактивных ТКР, выглядит многообещающим. В результате такой терапии происходит направленное устранение узкой группы Т-лимфоцитов, включающей патогенный клон. Появление технологий NGS дало импульс к развитию новых подходов, позволяющих проводить глубокий анализ репертуаров ТКР. Сложность анализа заключается в чрезвычайном разнообразии ТКР [19], именно поэтому выявление патологического Т-клона при сравнении репертуаров ТКР больного и здорового доноров представляется трудоемкой задачей. Кроме того,

важно учитывать, что структурные особенности белков главного комплекса гистосовместимости, участвующих в представлении антигенов, также оказывают влияние на формирование Т-клеточного репертуара.

Несмотря на все эти препятствия, в 2017 г. удалось найти Т-клеточные клоны, потенциально вовлеченные в патогенез АС, и выделить консенсусный мотив CDR3 [20, 21]. Показано, что такие клоны представлены у больных АС в синовиальной жидкости и периферической крови. Примечательно, что при той же глубине анализа у здоровых доноров потенциально патогенные ТКР отсутствуют независимо от того, являются доноры носителями аллеля HLA*B27 или нет. Выявленные АС-ассоциированные ТКР содержали генный сегмент TRBV9 (согласно номенклатуре IMGT), кодирующий вариативный домен β -цепи. Все эти данные указывают на возможность использования моноклонального антитела к TRBV9 для лечения АС.

Для эффективной терапии аутоиммунных заболеваний необходимо, чтобы несущие патогенный ТКР Т-клетки были элиминированы. Известно, что антитела класса IgG1, содержащие в своем составе Fc-фрагмент, связываясь с клеткой-мишенью, приводят к ее смерти. Описано два возможных механизма этого процесса: антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Механизм ADCC заключается в следующем: антитело, несущее определенный Fc, связывает свой эпитоп на поверхности клетки. Fc-домен, в свою очередь, узнает эффекторная Т-клетка (спектр клеток, несущих рецептор широк), которая несет рецептор FcR или CD16. В ответ на формирование такого тройственного комплекса внутри эффекторной Т-клетки запускается каскад, приводящий к высвобождению цитотоксических гранул. В результате клетка-мишень погибает через перфорин-гранзимовый путь. Эффективность связывания Fc-фрагмента с рецептором на эффекторных Т-клетках зависит от аллотипа данного иммуноглобулина и паттерна гликозилирования его аминокислотной последовательности. В зависимости от этого цитотоксическая активность антитела может значительно меняться [22]. CDC работает похожим образом, только в данном случае на антителе собирается комплемент, который активирует каскадный путь, ведущий к апоптозу. Таким образом, для того чтобы добиться элиминации целевых Т-клеток, при моделировании терапевтического антитела мы использовали IgG1 Fc-фрагмент такого же аллотипа, как и в лечебном антителе *rituximab*.

Целью данного исследования было определить специфичность и оценить цитотоксичность в системе *in vitro* разных вариантов моноклональных антител к вариативному TRBV9-домену β -цепи ТКР.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Доноры крови

Для анализа специфичности полученных антител с помощью проточной цитометрии и цитотоксического теста *in vitro* использовали периферическую кровь двух доноров мужчин в возрасте 53 лет. Взятие образцов крови проводили 7 раз, не чаще одного раза в неделю. Исследование было одобрено этическим комитетом НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева Минздрава России (протокол № 2013-5/4).

Выделение клеток мононуклеарной фракции крови

Образцы периферической крови собирали в пробирки Vacuette с K2-EDTA (по 4 мл), разбавляли в 4 раза с помощью PBS. Далее в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина с плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко; Россия) выделяли мононуклеарную фракцию (PBM). Наслаивали разбавленный образец крови на раствор фиколла-урографина в объемном соотношении 1/1. Центрифугировали в бакетном роторе при комнатной температуре на скорости 400 g 30 мин. Собирали клеточную суспензию на интерфазе и два раза промывали с помощью PBS. Центрифугировали на скорости 400 g 10 мин при комнатной температуре. Определяли выход мононуклеаров с помощью подсчета клеток в камере Горяева.

Получение химерных антител и кинетический скрининг антител с помощью биослойной интерферометрии

Препараты антител для тестирования были наработаны биотехнологической компанией *BioCad*. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности МА-K1, МА-K2, МА-K3, МА-K4 были опубликованы в патентной заявке. Моноклональные антитела МА-K1, МА-K2, МА-K3, МА-K4 содержали химерные последовательности тяжелой цепи (H) и легкой цепи (L), которые включали в себя вариативный домен иммуноглобулина крысы и константный домен иммуноглобулина человека. «Степень гуманизации» антител составляла 65%.

Определение константы диссоциации комплексов растворимого ТКР и химерного АТ проводили на приборе ForteBio Octet RED384 (Pall Corporation; США). Растворимый ТКР в концентрации 20 мкг/мл иммобилизовали на поверхность AR2G сенсоров (ForteBio) с последующей деактивацией 1 М этаноламином (pH 8.5) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя. Анализ проводили при 30 °C с использованием PBS, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% BSA в качестве рабочего буфера. После определения базовой линии сенсоры погружали в лунки с раствором антител в концентрации 67 нМ на 300 с, где образовывался комплекс. Затем детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течение 600 с. Кривые связывания с вычетом референсного сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1 Global.

Цитометрический анализ

Для визуализации работы полученных моноклональных антител МА-K1, МА-K2, МА-K3 и МА-K4 проводили мечение с помощью флуоресцеина. Использовали реагент флуоресцеин изотиоцианат (Sigma; США), мечение проводили по протоколу производителя. Контроль количества флуорохромов, вступивших в реакцию с молекулами антитела, осуществляли по соотношению спектра поглощения при длинах волн 495/280 нм.

10⁶ клеток PBMC, выделенные на градиенте фиколла-урографина (см. выше), инкубировали с каждым из тестируемых моноклональных антител МА-K1, МА-K2, МА-K3 и МА-K4, меченных FITC, в двух концентрациях: 3 мкг/мл (А) и 200 нг/мл (В), добавляли также CD3-eFluor450 (clone UCHT1, eBioscience; США) в количестве, рекомендуемом производителем. Тест проводили в 50 мкл 1X PBS, содержащего 0,5% BSA. Инкубировали при

комнатной температуре 20 мин, после чего отмывали тем же раствором.

Клеточная сортировка и секвенирование

К 3×10^6 PBMC добавляли 100 мкл раствора PBS/BSA 0,5%, 6 мкл anti-CD3-eFluor 450 (clone UCHT1; eBioscience; США) и отдельно каждое MA-K1, MA-K2, MA-K3, MA-K4, меченное FITC до конечной концентрации 100 нг/мл. Инкубировали при комнатной температуре 20 мин, отмывали 0,5% раствором PBS/BSA.

Анализ и сортировку клеточных популяций проводили на приборе FACSariaIII (BD; США). Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили ограничения в гистограммы распределения по малоугловому и боковому светорассеиванию, выделяя популяцию, соответствующую моноклеточной фракции клеток крови. Последовательным гейтированием выделяли на двупараметрической гистограмме популяцию клеток: CD3⁺TRBV9⁺ и CD3⁺TRBV9⁻.

Для контроля качества сортировки проводили ре-сортировку популяции CD3⁺TRBV9⁺, которая показала, что обогащение клетками целевой популяции составило 95%. Далее клетки собирали в буфер RLT (Qiagen; Германия), выделяли суммарную РНК с помощью набора реагентов Qiagen RNeasy mini kit #217004 согласно протоколу производителя. Полученную суммарную РНК использовали для синтеза кДНК и дальнейшей амплификации фрагмента β-цепи ТКР по протоколу, описанному в работе [23]. К полученным ампликонам лигировали адапторы (Illumina; США) и секвенировали на платформе MiSeq (Illumina; США). Данные секвенирования анализировали с помощью программ MiGEC, MiXCR и VDJtools [24], как описано в работе [25]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ GraphpadPrism 3.0.

Цитотоксический тест

Проверку цитотоксичности химерных антител проводили на PBMC, выделенных из двух доноров. Образцы периферической крови собирали в пробирки Vacuette с K2-EDTA. Моноклеточную фракцию клеток крови выделяли так же, как описано выше.

После выделения клетки переносили в PBS, содержащий 0,5% BSA и 2 mM EDTA. Аликвоту клеток использовали для подсчета общего количества клеток. Их жизнеспособность определяли по методу окрашивания с трипановым синим. Для определения эффективности цитотоксичности, $3-4 \times 10^6$ клеток инкубировали в течение 1 ч с антителом MA-K2 в концентрации: 1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл и 1 мкг/мл. Затем клетки два раза промывали PBS, переносили в среду RPMI, содержащую 10% человеческой сыворотки (BioIVT; Великобритания), и инкубировали 24 ч в CO₂ инкубаторе. После этого собирали клетки, проводили

окрашивание с антителами CD4-PE (clone RPA-T4; BD Bioscience; США), CD8-FITC (clone SK3; eBioscience; США), CD3-eFluor450 (clone UCHT1; eBioscience; США) и TO-Pro3readyflow (ThermoFisher; США) согласно протоколу производителя с последующим цитометрическим анализом на клеточном сортере FACSariaIII (BD; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Химерные моноклональные антитела MA-K1, MA-K2, MA-K3, MA-K4 специфически связывают растворимый ТКР, содержащий TRBV9

В данной работе использовали 4 варианта моноклонального антитела к TRBV9 (MA-K1, MA-K2, MA-K3, MA-K4), различающихся аминокислотными последовательностями гипервариабельного домена (CDR3).

Количественные характеристики (константы диссоциации и скорости диссоциации комплексов растворимого ТКР и химерных (MA-K1, MA-K2, MA-K3, MA-K4) антител) были определены методом биослойной интерферометрии (ForteBio, Pall Corporation; США) и методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (см. таблицу)). Все варианты иммуноглобулинов показали высокую специфичность и эффективное связывание с целевым растворимым ТКР, который был закодирован генным сегментом TRBV9, и не взаимодействовали с ТКР, содержащим вариабельный домен, который кодировался другим генным сегментом (TRBV7). Специфичность взаимодействия исследуемых антител не зависела от того, какая α-входила в состав комплекса ТКР. Было проверено два комплекса ТКР, содержащих в своем составе TRBV9 и TRAV26 или TRAV38, в обоих случаях связывание с антителами было одинаковым. В результате этого эксперимента нами были отобраны два клона MA-K2 и MA-K4, для которых константы диссоциации и скорости диссоциации были минимальными ($K_D < 1.0 \times 10^{-12}$ и $k_{dis} < 1.0 \times 10^{-7}$ 1/с) (таблица).

Аффинность для цитотоксических антител часто напрямую определяет эффективные концентрации, специфичность и безопасность при использовании *in vivo*. Высокое сродство к антигену химерных MA-K2 и MA-K4 создает хорошую предпосылку к использованию данных антител в терапевтических целях.

Химерные иммуноглобулины специфично выделяют популяцию TRBV9⁺ лимфоцитов

Для последующего цитометрического анализа клеточных популяций полученные химерные антитела MA-K1, MA-K2, MA-K3 и MA-K4 конъюгировали с флуоресцеином. Использование напрямую меченных флуорохромом моноклональных антител значительно увеличивает информативность цитометрических исследований.

Вся панель химерных MA в концентрации 3 мкг/мл окрашивала около 3% популяции CD3⁺положительных

Таблица. Взаимодействие исследуемых антител MA-K1, MA-K2, MA-K3, MA-K4 с различными комплексами ТКР. Приведены константы связывания и диссоциации образующихся комплексов. Данные получены с помощью прибора ForteBio Octet RED384

MA	TRBV9 + TRAV26		TRBV9 + TRAV38		TRBV7 + TRAV38	
	Kd	Kdis	Kd	Kdis	Kd	Kdis
MA-K1	2,90E-10	1,79E-04	3,21E-10	2,26E-04	Не взаимодействует	
MA-K2	<1.0E-12	<1.0E-07	<1.0E-12	<1.0E-07	Не взаимодействует	
MA-K3	2,44E-10	1,63E-04	3,53E-10	1,23E-04	Не взаимодействует	
MA-K4	<1.0E-12	<1.0E-07	<1.0E-12	<1.0E-07	Не взаимодействует	

клеток (рис. 1А). При использовании более низкой концентрации 200 нг/мл (рис. 1Б), было показано, что 3 мкг/мл превышает предельную; при этой концентрации процент TRBV9⁺-клеток не менялся, но повышался процент неспецифического связывания антител с клетками CD3-фракции ($13 \pm 2\%$) (рис. 1).

На основании максимального соотношения процента клеток TRBV9⁺CD3⁺/TRBV9⁺CD3⁻ и высокой интенсивности

специфического сигнала флуоресцеина антитело МА-K2 было выбрано как наиболее перспективный кандидат для дальнейшей работы. Используя меченое антитело МА-K2, для определения оптимальной концентрации провели раститровку с понижением концентрации антитела с 200 до 2 нг/мл (рис. 1В). Тест проводили с использованием РВМС крови здорового донора. В результате, для окрашивания 10^6 клеток РВМС была определена

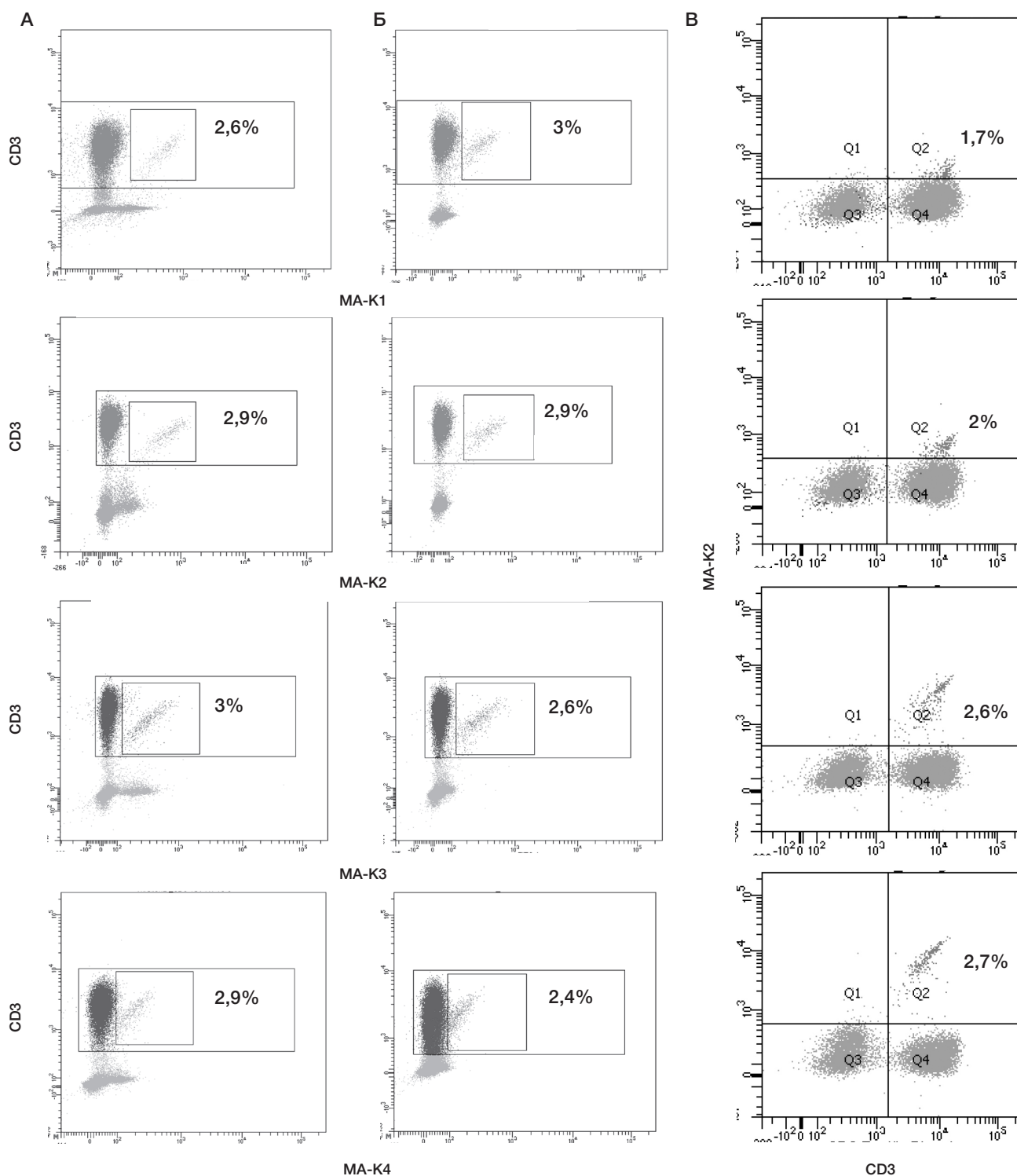


Рис. 1. Двухпараметрические гистограммы распределения клеток мононуклеарной фракции крови при окрашивании с помощью антитела против CD3-eFluor405 и 4 вариантов химерных антител против TRBV9, меченных FITC (МА-K1, МА-K2, МА-K3, МА-K4). Каждый вариант моноклонального антитела против TRBV9 был использован в двух концентрациях: 3 мкг/мл (А) или 200 нг/мл (Б) на 10^6 клеток. Специфическая популяция CD3⁺TRBV9⁺ обозначена маленьким квадратом. Процент TRBV9⁺CD3⁺-клеток показан от всех CD3⁺-лимфоцитов. В. Окрашивание клеток разными концентрациями химерного антитела МА-K2: 2 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл, 200 нг/мл (сверху вниз)

минимальная концентрация МА-K2 (50 нг/мл), при которой процент TRBV9⁺-клеток сохранялся на уровне 3% от популяции CD3⁺-клеток, а неспецифического связывания не наблюдалось.

Специфичность работы антитела МА-K2 была подтверждена с помощью сортировки субпопуляции лимфоцитов и последующего анализа репертуара ТКР методом секвенирования (рис. 2А). Для сортировки использовали РВМС, выделенные из образца периферической крови здорового донора, окрашенные флуоресцентно-мечеными антителами CD45, CD3 и МА-K2, которые использовали в концентрации 100 нг/мл (рис. 2А). Для анализа репертуара Т-клеточных рецепторов были собраны две популяции клеток, двойные позитивные по TRBV9 и CD3, а также TRBV9⁺CD3⁺-клетки. Сортировки проводили в двух технических повторностях. Такая постановка эксперимента была призвана показать эффективность сортировки целевой популяции лимфоцитов. В случае специфического

связывания антитела МА-K2 с Т-клеточным рецептором в популяции TRBV9⁺CD3⁺ должно наблюдаться обогащение библиотеки кДНК транскриптами, относящимся к TRBV9, а во второй, наоборот, целевые последовательности должны отсутствовать. Из этих образцов выделили суммарную РНК и провели синтез кДНК со специфических праймеров, комплементарных константному району β-цепи ТКР. Затем амплифицировали библиотеки и секвенировали с помощью NGS (MiSEQ, Illumina; CLIA). Анализ полученных репертуаров β-цепей ТКР показал, что библиотеки, полученные в результате сортировки с помощью антитела МА-K2, были обогащены на 93% последовательностями, которые кодировались геномным сегментом TRBV9. Тогда как в репертуарах β-цепей негативной фракции CD3⁺TRBV9⁺ последовательностей, содержащих TRBV9, обнаружено не было.

Полученные результаты указывают на высокую специфичность и эффективность используемого химерного антитела.

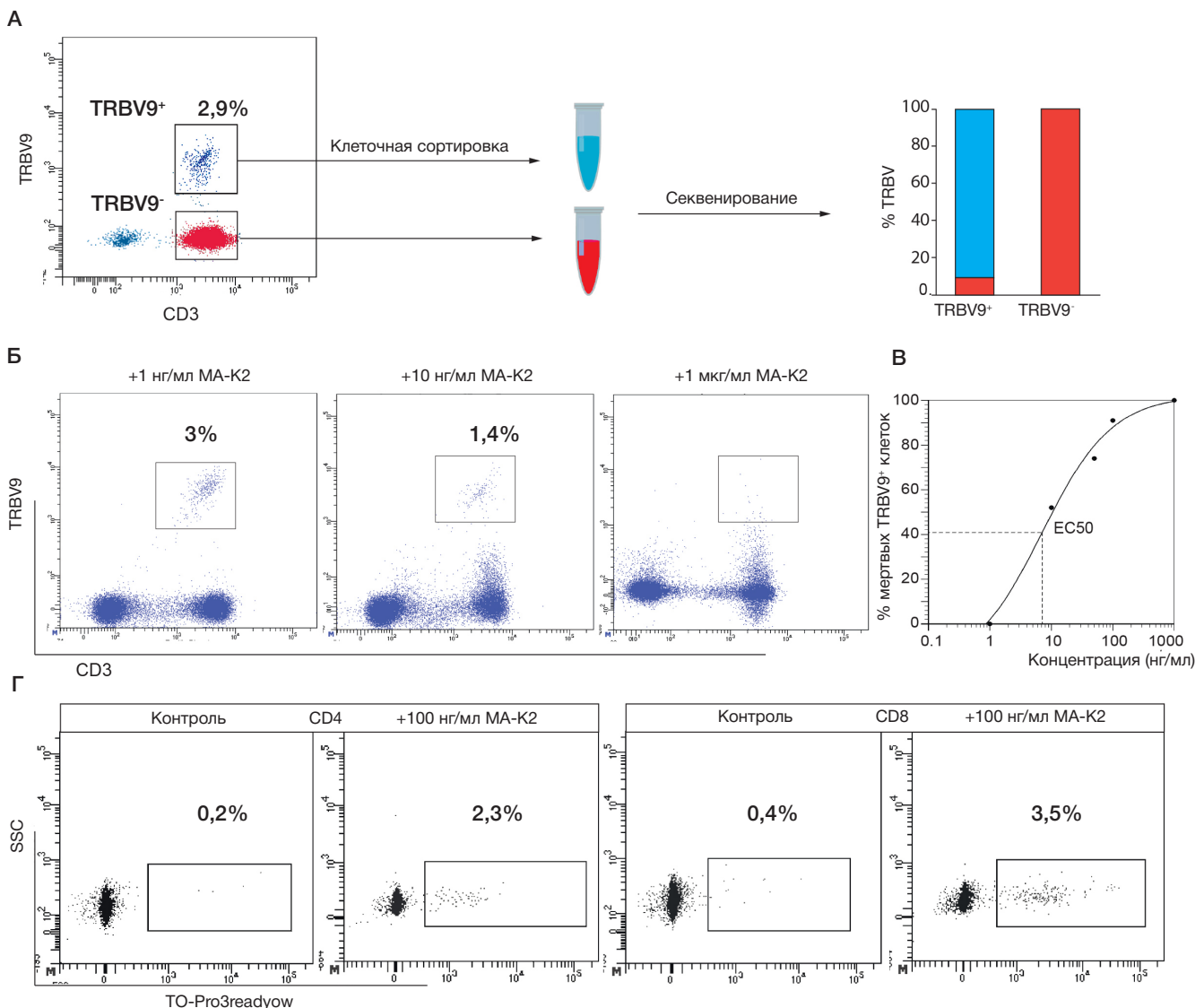


Рис. 2. А. Схема эксперимента по определению специфического взаимодействия химерного антитела МА-K2 с ТКР при помощи клеточной сортировки и последующего анализа репертуара ТКР сортированных Т-клеток. Две популяции Т-лимфоцитов были собраны: TRBV9⁺ (синий цвет) и TRBV9⁻ (красный цвет), далее проведен анализ репертуара ТКР этих популяций. Результаты анализа представлены в долевом отношении от всех ТКР, определенных секвенированием в образце. **Б.** Анализ цитотоксической активности химерного антитела МА-K2 с помощью цитометрического анализа. Показана гейтированная популяция по маркерам CD45⁺CD3⁺, прямоугольником показана популяция CD45⁺CD3⁺TRBV9⁺. **В.** Определение полуэффективной EC₅₀ концентрации МА-K2 в цитотоксическом тесте. **Г.** Процент мертвых клеток (%TO-Pro3readyflow+) при добавлении 100 нг/мл антитела МА-K2 к РВМС человека и окрашивании реактивом TO-Pro3readyflow. На параметрических гистограммах показаны гейтированные популяции CD4⁺CD3⁺- и CD8⁺CD3⁺-лимфоцитов. Популяция мертвых клеток выделена черным прямоугольником

Определение цитотоксичности химерных иммуноглобулинов

Для определения активности данного моноклонального антитела требовалось применение нестандартного подхода, что обуславливалось несколькими причинами. Во-первых, целевая популяция клеток составляла относительно небольшую в долевого отношении популяцию клеток в общем клеточном пуле (2,5% от CD3⁺-лимфоцитов). Во-вторых, эта популяция может быть выделена из общего пула только по одному уникальному поверхностному маркеру — Т-клеточному рецептору, в состав которого входит уникальный варибельный домен β -цепи. Это затрудняет использование клеточного сортирования для обогащения целевой TRBV9⁺ клеточной популяцией и проведения цитотоксического теста по классической схеме: целевая популяция клеток и натуральные киллеры в разных соотношениях.

Таким образом, цитотоксическую активность МА-K2 детектировали с помощью цитофлуориметрического метода. В качестве клеточной смеси использовали мононуклеарную фракцию клеток крови, которая содержит как целевую популяцию клеток, так и необходимые клеточные популяции, опосредующие цитотоксическую реакцию (натуральные киллеры и т. д.). Полуэффективная цитотоксическая концентрация (EC_{50}) антитела МА-K2 была определена в серии *in vitro* экспериментов. Цитотоксический эффект оценивали по прогрессивно снижающейся доле TRBV9-позитивных клеток в популяции CD3⁺-лимфоцитов, что коррелировало с увеличением концентрации антитела МА-K2 (рис. 2Б). При концентрации 100 нг/мл наблюдали полную элиминацию популяции клеток TRBV9⁺CD3⁺. Таким образом, EC_{50} для антитела МА-K2 составила 7 нг/мл (рис. 2Б).

В эксперименте по определению процента мертвых клеток среди CD4⁺CD3⁺ и CD8⁺CD3⁺-лимфоцитов после инкубации с антителом МА-K2 добавляли краситель TO-Pro3readyflow (ThermoFisher) (рис. 2Г). Через 24 ч после инкубации с тестируемым антителом при концентрации 100 нг/мл наблюдалось значительное увеличение доли мертвых клеток по сравнению с контролем (рис. 2Г). Этот эксперимент был сделан в семи повторностях, в каждой из которых мы наблюдали увеличение процента мертвых клеток в зависимости от концентрации вносимого антитела.

Таким образом, в системе *in vitro* была продемонстрирована цитотоксическая активность химерного антитела МА-K2. Полученные данные свидетельствуют о высокой цитотоксической активности исследуемого моноклонального химерного антитела в отношении клеток мишени и специфичности полученного антитела.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существующие лечебные антитела с успехом применяются для терапии тяжелых заболеваний, таких как рассеянный склероз, некоторые виды рака, дегенерация сетчатки. Разработка антител основывается на известных мишенях, вовлеченных в патогенез заболевания. Недавно была показана корреляция болезни Бехтерева и Т-клеточного клона, содержащего варибельный участок β -цепи, закодированный генным сегментом TRBV9 [20, 21]. Участие определенного Т-клона в развитии патогенного процесса еще требует дальнейшего подтверждения, но Т-клеточный рецептор сам по себе является перспективной мишенью для разработки терапевтического антитела.

Основным результатом этого исследования было получение цитотоксического химерного (человек–крыса) антитела МА-K2, которое высокоэффективно и специфично связывается с участком β -цепи ТКР, закодированным геном TRBV9. В работе для тестирования цитотоксичности антитела МА-K2 мы использовали метод проточной цитометрии и окрашивание с помощью красителя TO-Pro3readyflow (ThermoFisher; США), который позволяет с высокой точностью разделить живые и мертвые клетки. Такой подход не является общепринятым для оценки антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Так, в литературе описано несколько методов для оценки количества клеток, погибших в результате взаимодействия с цитотоксическим антителом, однако многие из них обладают рядом недостатков. Например, широко применяемый метод при анализе ADCC, основанный на детекции ⁵¹Cr [26], который высвобождается при специфическом лизисе клеток, не обладает достаточной чувствительностью, а также не позволяет оценить долю мертвых клеток в популяции. Это затрудняет его использование в случае, когда целевая фракция клеток составляет 3% и менее в клеточной смеси. Подход, который использовался в данной работе, был недавно успешно применен при оценке цитотоксичности антитела Trastuzumab для детекции менее 10% мертвых клеток как в клеточной культуре, так и в PBMC [27].

Мы предполагаем, что полученное нами антитело можно будет использовать для устранения *in vivo* популяции Т-клеток, ассоциированной с анкилозирующим спондилитом. Это должно привести к снижению симптоматического комплекса при АС. Как уже отмечалось, элиминация патологического клона при аутоиммунных заболеваниях является перспективным подходом, а также одной из ступеней к персонализированной медицине. В литературе существуют примеры успешного использования моноклональных антител против V β и для лечения аутоиммунных заболеваний в модельных системах. Так, в модельной системе у мышей с аутоиммунным энцефаломиелитом все аутореактивные клоны Т-клеток имели в составе ТКР домен, который кодировался генным сегментом V β 8 (TRBV13). После индукции заболевания пептидом MBP введение моноклонального антитела, специфичного к этому домену, оказывало защитный эффект, в результате которого заболевание не развивалось [28]. Другое моноклональное антитело к V β 8 (KJ16) было использовано для протекции мышей, в модели с коллаген-индуцированным артритом. Введение этого антитела привело к существенному снижению частоты возникновения артрита после индукции заболевания [29].

Следует также отметить, что процент клеток, несущих на своей поверхности ТКР, участок которого кодируется TRBV9, невысок и не превышает 3%. Этот факт позволяет предположить, что при введении антитела против TRBV9 в организм не будет наблюдаться сильного токсического эффекта, вызванного гибелью большого числа клеток и цитокинового релиза («цитокиновый шторм»), как в случае с некоторыми анти-CD3 моноклональными антителами [30].

На сегодняшний день для таргетной терапии применяются моноклональные антитела с различной степенью гуманизации, которая необходима для снижения иммуногенности препарата. Можно выделить три основных типа: химерные (константный домен от человека и варибельный домен мыши), гуманизированные (человеческое антитело и мышиный CDR) и полностью гуманизированное [31]. МА-K2, свойства которого изучались

в данной работе, гуманизировано на 65%. На следующем этапе исследования мы планируем провести направленную гуманизацию МА-K2 и выйти с гуманизированными вариантами антител на эксперименты в *in vivo* системе на приматах.

ВЫВОДЫ

В ходе работы было охарактеризовано четыре химерных моноклональных антитела к TRBV9 (МА-K1, МА-K2, МА-K3, МА-K4), отличающиеся аминокислотными последовательностями гипервариабельного домена

(CDR3). Семейство TRBV9, по литературным данным, ассоциировано с патогенезом АС. На основе биохимических характеристик (Kd, Kdis, специфичности) для дальнейших исследований было выбрано МА-K2, которое обладало высокой специфичностью и цитотоксичностью в отношении клеток-мишеней. В дальнейшем планируется получить гуманизированный вариант антитела и провести исследования *in vivo* на приматах. В случае, если в этих экспериментах удастся количественно элиминировать популяцию Т-клеток, несущую TRBV9, это моноклональное антитело можно рассматривать как инструмент к изучению АС и потенциальный препарат для таргетной терапии АС.

Литература

- Haibel H, Fendler C, Listing J, Callhoff J, Braun J, Sieper J. Efficacy of oral prednisolone in active ankylosing spondylitis: results of a double-blind, randomised, placebo-controlled short-term trial. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73 (1): 243–6.
- Riñl M, Baerlecken N, Wiese B, Schmidt RE, Zeidler H. Intravenous glucocorticoid pulse therapy in active, NSAID refractory axial ankylosing spondylitis: a retrospective analysis spanning 12 months. *J Arthritis*. 2018; (7): 1. DOI: 10.4172/2167-7921.1000266.
- Fujita T, Kutsumi H, Sanuki T, Hayakumo T, Azuma T. Adherence to the preventive strategies for nonsteroidal anti-inflammatory drug- or low-dose aspirin-induced gastrointestinal injuries. *J Gastroenterol*. 2013; (48): 559–73. DOI: 10.1007/s00535-013-0771-8.
- Xu T, Ying T, Wang L, Zhang XD, Wang Y, Kang L et al. A native-like bispecific antibody suppresses the inflammatory cytokine response by simultaneously neutralizing tumor necrosis factor- α and interleukin-17A. *Oncotarget*. 2017; 8 (47): 81860–72. DOI: 10.18632/oncotarget.19899.
- van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP, Dougados M, Burgos-Vargas R, Landewé R et al. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; (70): 905–8.
- Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359 (9313): 1187–93.
- Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, Maksymowych WP, Scott BB, Boice JA et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, sixteen-week study of subcutaneous golimumab in patients with active nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. (Hoboken, N.J.). 2015; 67 (10): 2702–12. DOI: 10.1002/art.39257.
- Haroon N, Inman RD, Leach TJ, Weisman MH, Lee MJ, Rahbar MH, et al. The impact of TNF-inhibitors on radiographic progression in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumat*. 2013; 65 (10): 2645–54. DOI: 10.1002/art.38070.
- Callhoff J, Sieper J, Weiss A, Zink A, Listing J. Efficacy of TNF blockers in patients with ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015; (74): 1241–48.
- Baeten D, Baraliakos X, Braun J, Sieper J, Emery P et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013; 382 (9906): 1705–13.
- Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P et al. Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N Engl J Med*. 2015; (373): 2534–48.
- Helling B, König M, Dälken B, et al. A specific CD4 epitope bound by tregalizumab mediates activation of regulatory T cells by a unique signaling pathway. *Immunol Cell Biol*. 2015; 93 (4): 396–405. DOI: 10.1038/icb.2014.102.
- Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy*. 2016; 8 (8): 889–906.
- König M, Rharbaoui F, Aigner S, Dälken B, Schüttrumpf J. Tregalizumab – A Monoclonal antibody to target regulatory T cells. *Front Immunol*. 2016; (7): 11. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00011.
- Duarte J, Agua-Doce A, Oliveira V, Fonseca JE, Graca L. Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice. *PLoS One*. 2010; 5 (5): e10558. DOI: 10.1371/journal.pone.0010558.
- Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen W. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med*. 2008; 14 (5): 528–35. DOI: 10.1038/nm1749.
- Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; (6): 883–94.
- Lavasani S, Dzhabazov B, Andersson M. Monoclonal antibody against T-cell receptor $\alpha\beta$ induces self-tolerance in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; (65): 39–47. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.01866.x.
- Qia Q, Liub Y, Chengd Y, Glanville J, Zhanga D, Leec J-Y. et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *PNAS*. 2014; 111 (36): 13139–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409155111>.
- Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F. et al. Discovery of T cell receptor β motifs specific to HLA-B27–Positive ankylosing spondylitis by deep Repertoire sequence analysis. *Arthritis & Rheumatology*. 2017; (69): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
- Komech E, Pogorely M, Egorov E, Britanova O, Rebrikov D, Bochkova A, et al. CD8+ T cells with characteristic T cell receptor beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology*. 2018; 579 (6): 1097–104. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex517>.
- Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM et al. A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2011; 24 (9): 671–8. <https://doi.org/10.1093/protein/gzr015>.
- Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol*. 2016; 15, 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
- Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV. et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS computational biology*. 2015; (11): e1004503.
- Egorov ES, Kasatskaya SA, Zubov VN, Izraelson M, Nakonechnaya TO, Staroverov DB et al. The changing landscape of naive T cell receptor repertoire with human aging. *Front Immunol*. 2018; (9): 1618. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01618>.
- Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled

allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. 1968; 14 (2): 181–96.

27. Yamashita M, Kitano S, Aikawa H, Kuchiba A, Hayashi M, Yamamoto N, et al. A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flow cytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*. 2016; (6): 19772. DOI: 10.1038/srep19772.
28. Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, Waldor MK, et al. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell*. 1988; 54 (2): 263–73.
29. Chiocchia G, Boissier M, Fournier, C. Therapy against murine collagen-induced arthritis with T cell receptor V β -specific antibodies. *Eur J Immunol*. 1991; (21): 2899–905. DOI:10.1002/eji.1830211202.
30. Bugelski PJ, Achuthanandam R, Capocasale RJ, Treacy G, Bouman-Thio E. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009; 5 (5): 499–521.
31. Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F. The advent of monoclonal antibodies in the treatment of chronic autoimmune diseases. *Neurol Sci*. 2011; 31 (Suppl 3): 283–288. DOI 10.1007/s10072-010-0382-6.
1. Haibel H, Fendler C, Listing J, Callhoff J, Braun J, Sieper J. Efficacy of oral prednisolone in active ankylosing spondylitis: results of a double-blind, randomised, placebo-controlled short-term trial. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73 (1): 243–6.
2. Rühl M, Baerlecken N, Wiese B, Schmidt RE, Zeidler H. Intravenous glucocorticoid pulse therapy in active, NSAID refractory axial ankylosing spondylitis: a retrospective analysis spanning 12 months. *J Arthritis*. 2018; (7): 1. DOI: 10.4172/2167-7921.1000266.
3. Fujita T, Kutsumi H, Sanuki T, Hayakumo T, Azuma T. Adherence to the preventive strategies for nonsteroidal anti-inflammatory drug- or low-dose aspirin-induced gastrointestinal injuries. *J Gastroenterol*. 2013; (48): 559–73. DOI: 10.1007/s00535-013-0771-8.
4. Xu T, Ying T, Wang L, Zhang XD, Wang Y, Kang L et al. A native-like bispecific antibody suppresses the inflammatory cytokine response by simultaneously neutralizing tumor necrosis factor- α and interleukin-17A. *Oncotarget*. 2017; 8 (47): 81860–72. DOI: 10.18632/oncotarget.19899.
5. van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP, Dougados M, Burgos-Vargas R, Landewé R et al. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; (70): 905–8.
6. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359 (9313): 1187–93.
7. Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, Maksymowych WP, Scott BB, Boice JA et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, sixteen-week study of subcutaneous golimumab in patients with active nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. (Hoboken, N.J.). 2015; 67 (10): 2702–12. DOI: 10.1002/art.39257.
8. Haroon N, Inman RD, Learch TJ, Weisman MH, Lee MJ, Rahbar MH, et al. The impact of TNF-inhibitors on radiographic progression in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumat*. 2013; 65 (10): 2645–54. DOI: 10.1002/art.38070.
9. Callhoff J, Sieper J, Weiss A, Zink A, Listing J. Efficacy of TNF blockers in patients with ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015; (74): 1241–48.
10. Baeten D, Baraliakos X, Braun J, Sieper J, Emery P et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013; 382 (9906): 1705–13.
11. Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P, et al/ Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N Engl J Med*. 2015; (373): 2534–48.
12. Helling B, König M, Dälken B, et al. A specific CD4 epitope bound by tregalizumab mediates activation of regulatory T cells by a unique signaling pathway. *Immunol Cell Biol*. 2015; 93 (4): 396–405. DOI: 10.1038/icb.2014.102.
13. Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy*. 2016; 8 (8): 889–906.
14. König M, Rharbaoui F, Aigner S, Dälken B, Schüttrumpf J. Tregalizumab — A Monoclonal antibody to target regulatory T cells. *Front Immunol*. 2016; (7): 11. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00011.
15. Duarte J, Agua-Doce A, Oliveira V, Fonseca JE, Graca L. Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice. *PLoS One*. 2010; 5 (5): e10558. DOI: 10.1371/journal.pone.0010558.
16. Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen W. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med*. 2008; 14 (5): 528–35. DOI: 10.1038/nm1749.
17. Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; (6): 883–94.
18. Lavasani S, Dzhambazov B, Andersson M. Monoclonal antibody against T-cell receptor $\alpha\beta$ induces self-tolerance in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; (65): 39–47. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.01866.x.
19. Qia Q, Liub Y, Chengd Y, Glanville J, Zhanga D, Leec J-Y, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *PNAS*. 2014; 111 (36): 13139–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409155111>.
20. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F, et al. Discovery of T cell receptor β motifs specific to HLA-B27–Positive ankylosing spondylitis by deep Repertoire sequence analysis. *Arthritis & Rheumatology*. 2017; (69): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
21. Komech E, Pogorelyy M, Egorov E, Britanova O, Rebrikov D, Bochkova A, et al. CD8+ T cells with characteristic T cell receptor beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology*. 2018; 57 (6): 1097–104. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex517>.
22. Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM et al. A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2011; 24 (9): 671–8. <https://doi.org/10.1093/protein/gzr015>.
23. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol*. 2016; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
24. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV, et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS computational biology*. 2015; (11): e1004503.
25. Egorov ES, Kasatskaya SA, Zubov VN, Izraelson M, Nakonechnaya TO, Staroverov DB et al. The changing landscape of naive T cell receptor repertoire with human aging. *Front Immunol*. 2018; (9): 1618. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01618>.
26. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled

- allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. 1968; 14 (2): 181–96.
27. Yamashita M, Kitano S, Aikawa H, Kuchiba A, Hayashi M, Yamamoto N, et al. A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flow cytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*. 2016; (6): 19772. DOI: 10.1038/srep19772.
 28. Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, Waldor MK, et al. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell*. 1988; 54 (2): 263–73.
 29. Chiochia G, Boissier M, Fournier C. Therapy against murine collagen-induced arthritis with T cell receptor V β -specific antibodies. *Eur J Immunol*. 1991; (21): 2899–905. DOI:10.1002/eji.1830211202.
 30. Bugelski PJ, Achuthanandam R, Capocasale RJ, Treacy G, Bouman-Thio E. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009; 5 (5): 499–521.
 31. Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F. The advent of monoclonal antibodies in the treatment of chronic autoimmune diseases. *Neurol Sci*. 2011; 31 (Suppl 3): 283–288. DOI 10.1007/s10072-010-0382-6.