

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## EXPERIMENTAL STUDIES

### Получение специфичных к антигену CD87 CAR T-лимфоцитов и оценка их функциональной активности *in vitro*

**М.В. Неклесова, С.В. Смирнов, А.А. Шатилова,  
К.А. Левчук, А.Е. Ершова, С.А. Силонов**

НЦМУ «Центр персонализированной медицины»,  
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова,  
д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

### Production of CD87 Antigen-Specific CAR-T Lymphocytes and Assessment of Their *In Vitro* Functional Activity

**MV Neklesova, SV Smirnov, AA Shatilova, KA Levchuk,  
AE Ershova, SA Silonov**

Center for Personalized Medicine,  
VA Almazov National Medical Research Center,  
2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

#### РЕФЕРАТ

**Цель.** Создание анти-CD87 CAR T-лимфоцитов и оценка их функциональной активности *in vitro*.

**Материалы и методы.** Выделенные из периферической крови здорового донора T-лимфоциты трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим гены анти-CD87-CAR, T2A и FusionRed. Эффективность трансдукции, оцениваемая по уровню сигнала репортерного белка FusionRed, субпопуляционный состав и функциональное состояние CAR T-лимфоцитов определены методом проточной цитометрии. Экспрессия интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) CAR T-лимфоцитами изучалась с помощью иммуноферментного анализа. Оценка цитотоксической активности CAR T-лимфоцитов выполнялась при сокультивировании с клетками-мишенями HeLa с помощью системы анализа клеток в реальном времени xCELLigence.

**Результаты.** Эффективность трансдукции T-лимфоцитов составила 8,4 %. Полученные CAR T-клетки содержали как маркеры активации CD27 и/или CD28 (92,91 % случаев), так и маркер истощения PD1 (20,66 %). В популяции CAR T-лимфоцитов фенотип T-клеток центральной памяти составил 98,51 %, а соотношение CD4/CD8 — 1:7. Концентрация IFN- $\gamma$  в среде после сокультивирования CAR T-лимфоцитов с клетками-мишенями оказалась значимо выше, чем в контрольных образцах. Показано, что полученные CAR T-лимфоциты проявляют специфическую цитотоксичность по отношению к клеткам-мишеням как немодифицированной, так и повышенной экспрессии антигена CD87 клеточных линий HeLa. Цитотоксичность оказалась более выраженной в отношении линии клеток с повышенной экспрессией антигена CD87.

**Заключение.** Несмотря на повышенную экспрессию маркера истощения PD1, CAR T-лимфоциты продемонстрировали специфическую секрецию IFN- $\gamma$  и выраженную цитотоксическую активность при взаимодействии с антигеном CD87 на мембране клеток-мишеней. Следовательно-

#### ABSTRACT

**Aim.** To generate anti-CD87 CAR-T lymphocytes and to assess their *in vitro* functional activity.

**Materials & Methods.** T-lymphocytes isolated from healthy donor peripheral blood were transduced with the anti-CD87-CAR, T2A, and FusionRed gene coding lentiviral vector. Transduction efficacy assessed by reporter protein FusionRed signal, subpopulation structure, and functional status of CAR-T lymphocytes were determined by flow cytometry. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) expression by CAR-T lymphocytes was analyzed using immunoassay. Cytotoxic activity of CAR-T lymphocytes was evaluated during their co-cultivation with HeLa target cells by means of xCELLigence real-time assay.

**Results.** The efficacy of T-lymphocyte transduction was 8.4 %. The obtained CAR-T cells contained the markers of both CD27 and/or CD28 activation (92.91 % cases) and PD1 exhaustion (20.66 % cases). The population of CAR-T lymphocytes showed 98.51 % central memory T-cell phenotype and CD4/CD8 ratio of 1:7. IFN- $\gamma$  concentration in the medium after co-cultivation of CAR-T lymphocytes with target cells appeared to be significantly higher than in control samples. The study demonstrates that generated CAR-T lymphocytes manifest specific cytotoxicity towards target cells with both unmodified expression and overexpression of CD87 antigen in HeLa cell lines. Cytotoxicity proved to be more pronounced with respect to the cell line with CD87 antigen overexpression.

**Conclusion.** Despite overexpression of PD1 exhaustion marker, CAR-T lymphocytes showed specific IFN- $\gamma$  secretion and pronounced cytotoxic activity in interaction with CD87 antigen on target cell membranes. Therefore, anti-CD87 CAR-T lymphocytes can be applied in the treatment of hematologic as well as solid tumors. Since the observed difference in cytotoxicity does not linearly correlate with CD87 antigen density on the surface of attacked cells, the *in vivo* administration of a CAR-T cell

но, анти-CD87 CAR T-лимфоциты могут использоваться для лечения как гематологических, так и солидных опухолей. Поскольку наблюдаемая разница в цитотоксичности не коррелирует линейно с плотностью антигена CD87 на поверхности атакуемых клеток, при применении CAR T-клеточного препарата *in vivo* необходимо исключить вероятность цитотоксического воздействия на здоровые клетки, экспрессирующие CD87.

**Ключевые слова:** CD87, uPAR, CAR T-лимфоциты, острые миелоидные лейкозы.

**Получено:** 27 июня 2022 г.

**Принято в печать:** 10 сентября 2022 г.

*Для переписки:* Сергей Владимирович Смирнов, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(964)612-57-14; e-mail: sergeiismirnoff@gmail.com

*Для цитирования:* Неклесова М.В., Смирнов С.В., Шатилова А.А. и др. Получение специфичных к антигену CD87 CAR T-лимфоцитов и оценка их функциональной активности *in vitro*. Клиническая онкогематология. 2022;15(4):340–8.

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-340-348

drug should be designed to prevent cytotoxic risk for CD87-expressing healthy cells.

**Keywords:** CD87, uPAR, CAR-T lymphocytes, acute myeloid leukemias.

**Received:** June 27, 2022

**Accepted:** September 10, 2022

*For correspondence:* Sergei Vladimirovich Smirnov, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel.: +7(964)612-57-14; e-mail: sergeiismirnoff@gmail.com

*For citation:* Neklesova MV, Smirnov SV, Shatilova AA, et al. Production of CD87 Antigen-Specific CAR-T Lymphocytes and Assessment of Their In Vitro Functional Activity. Clinical oncohematology. 2022;15(4):340–8. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-340-348

## ВВЕДЕНИЕ

CD87 (uPAR) был впервые идентифицирован как поверхностный рецептор для активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназы, uPA) в 1985 г. [1]. Он представляет собой гликозилированный трехдоменный белок, закрепленный с помощью гликозилфосфатидилинозитолового якоря на мембране клеток разного типа, но в основном экспрессируется на клетках костного мозга. Данный рецептор имеет сайты связывания со множеством лигандов, основными из которых является uPA, а также его профермент pro-uPA — эффекторы в системе активации плазминогена. Каскад протеолитических реакций, осуществляемый данной системой на поверхности клетки [2], приводит к превращению плазминогена в плазмин, являющийся сериновой протеазой, которая участвует в регуляции гемостаза посредством активации фибринолиза. Кроме того, плазмин может активировать матриксные металлопротеиназы, которые, в свою очередь, обеспечивают деградацию внеклеточного матрикса и разрушение базальной мембраны [3].

Можно заключить, что основные физиологические процессы, в которых задействован CD87, — это репарация тканей и восстановление кровотока при деструкции тромба за счет инициирования деградации фибрина. Однако uPAR также способен ко взаимодействию с витронектином, интегринами и другими молекулами, что может активировать внутриклеточную передачу сигналов, регулирующих клеточную адгезию, миграцию, выживание и пролиферацию [4, 5]. Во многих исследованиях сообщается о чрезмерной активации компонентов системы урокиназы и ее рецептора при злокачественных новообразованиях, как гематологических, так и солидных.

Подчеркивается корреляция между повышенной экспрессией CD87 и подвижностью, способностью к инвазии и метастазированию опухолевых клеток [6] при таких злокачественных новообразованиях, как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), колоректальный рак, меланома, рак легкого, молочной и поджелудочной желез, простаты [7–12]. Так, отмечается повышенная экспрессия компонентов системы uPA на метастазирующих эпителиальных опухолевых клетках рака молочной железы, что может быть связано с активацией протеолитического каскада [13]. Кроме того, экспрессия CD87 была зафиксирована на эндотелиальных клетках и связанных с опухолью макрофагах, что, согласно исследованиям, коррелировало с агрессивным течением опухоли и низкими показателями выживаемости пациентов [14, 15]. Помимо злокачественных клеток CD87 может повышенно экспрессироваться и в ассоциированном с опухолью стромальном микроокружении, например в макрофагах, эндотелиоцитах и миофибробластах при колоректальном раке [16]. В случаях такой ко-экспрессии нацеливание на uPAR может привести к усилению противоопухолевого эффекта.

Данные многочисленных исследований позволяют сделать вывод о необходимости разработки терапии с использованием химерного антигенного рецептора (CAR) T-лимфоцитов, направленных на CD87. Известно, что CAR T-терапия успешно применяется для лечения В-клеточного острого лимфобластного лейкоза и некоторых лимфом при нацеливании на антиген CD19. Ключом к успеху в применении CAR T-терапии являются специфичность экспрессии данного антигена на поверхности В-лимфоцитов и физическая доступность клеточной мембраны злокачественных клеток для взаимодействия с противоопухолевым препаратом. Кроме того, в на-

стоящее время проводится множество клинических исследований, в которых оценивается эффективность применения CAR T-лимфоцитов при ОМЛ, поскольку, несмотря на достигнутые преимущества при использовании таргетной терапии и трансплантации аллогенного костного мозга, все еще остается когорта пациентов с рецидивами и рефрактерным течением заболевания, характеризующаяся крайне неблагоприятным прогнозом.

Хотя полное удаление как злокачественных, так и здоровых В-клеток, экспрессирующих CD19, клинически допустимо, основной проблемой, ограничивающей использование CAR T-лимфоцитов при ОМЛ, является отсутствие специфического опухолевого антигена. Одной из перспективных мишеней для дальнейшего изучения и разработки направленных CAR T-лимфоцитов служит антиген CD87, который экспрессируется на опухолевых клетках и отсутствует на гемопоэтических стволовых клетках [17]. Высокий уровень экспрессии CD87 (> 25 %) на бластных клетках при ОМЛ наблюдается в 72–81 % случаев и значительно чаще при миеломоноцитарном морфологическом варианте [17–19]. Пациенты с гиперэкспрессией CD87 имеют худшие показатели общей выживаемости по сравнению с когортой больных с низким уровнем экспрессии CD87 (медиана выживаемости 17 vs 25 мес.;  $p = 0,0188$ ) [17]. Однако антиген CD87 с гиперэкспрессией на миелоидных клетках также коэкспрессируется на клетках здоровых тканей [20]. Несмотря на то что экспрессия CD87 не обнаружена на тромбоцитах и покоящихся В- и Т-лимфоцитах, его экспрессируют активированные естественные киллеры (NK) и Т-клетки [18]. Данный факт, с одной стороны, положительным образом коррелирует с инвазией активированных Т-лимфоцитов [21, 22], однако одновременно может служить лимитирующим фактором при применении анти-CD87 CAR T-клеточной терапии.

Учитывая гетерогенность ОМЛ и неспецифическую экспрессию опухолевых антигенов, необходимо повысить специфичность и безопасность при применении *in vivo* CAR T-клеток. Например, для повышения селективности нацеливания на опухолевые бластные клетки была разработана молекула двойного действия, цитотоксичность которой зависела от экспрессии CD87 и активности сигнального пути MAPK [23].

Таким образом, для эффективного и безопасного лечения пациентов с онкологическими заболеваниями с помощью адаптивной CAR T-иммунотерапии, мишенью для которой является белок CD87, необходим комбинаторный подход. Последний заключается либо в независимом нацеливании на несколько антигенов, либо в использовании биспецифических CAR T-лимфоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточные линии и первичные культуры

Клеточные линии HEK293T и HeLa были получены из криохранилища лаборатории генной инженерии и клеточной терапии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ. Данные линии были протестированы на микоплазму и STR-типированы. Клетки хранились в крио-

среде, содержащей 10 % DMSO и 90 % FBS (Hyclone, США). Их размораживали на водяной бане при температуре 37 °C и культивировали три пересева до начала эксперимента. HEK293T использовались в качестве продуцента вирусных частиц. Клетки HeLa подвергались лентивирусной трансдукции для получения модельной клеточной линии с гиперэкспрессией CD87.

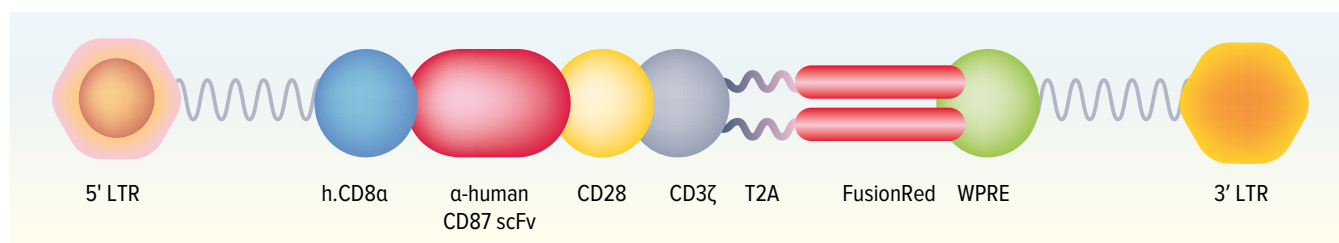
Первичная культура Т-лимфоцитов получена от здорового донора, подписавшего информированное согласие на взятие периферической крови в условиях лицензированного медицинского учреждения. Т-клетки выделялись и активировались с помощью магнитных частиц Dynabeads Human T-activatorCD3/CD28 (Invitrogen, США) из фракции мононуклеаров, отобранной после центрифугирования крови со скоростью 400 g в течение 45 мин в растворе фикола («ПанЭко», Россия) плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>.

Клеточные линии HEK293T и HeLa культивировались в среде DMEM, содержащей глутамин («ПанЭко», Россия) с 10 % FBS (Hyclone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Для культивирования первичной культуры Т-лимфоцитов использовалась среда RPMI-1640, содержащая глутамин («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % FBS (Hyclone, США) и 300 ед. акт./мл человеческого рекомбинантного интерлейкина-2 («Биотех», Россия). Клетки содержались в стерильных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Binder, поддерживающем постоянную температуру 37 °C и концентрацию CO<sub>2</sub> 5 %.

### Клонирование генов, кодирующих рецептор CD87 и анти-CD87-CAR в векторы PuroR\_pUltra-Hot и 9c\_CAR1\_vPAX1

Для клонирования гена CD87 выполнена замена белка mCherry на ген устойчивости к пурамицину в плазмиде pUltra-hot (Addgene plasmid #24130; <http://n2t.net/addgene:24130>; RRID:Addgene\_24130), любезно предоставленной Малколмом Муром (Мемориальный онкологический центр им. Слоуна и Кеттеринга, США), выделялась мРНК из клеток HeLa с помощью RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия), проводился синтез кДНК с использованием MMLV RT kit («Евроген», Россия) и амплификация гена CD87 с добавлением сайтов рестрикции EcoRI и AsuNHI. Для амплификации использовались набор Herculase II Fusion Enzyme with dNTPs Combo (Agilent Technologies, США) и следующие праймеры: F<sub>20</sub> для aatGCTAGCATGGGTCAACCCGCCG, R<sub>20</sub> для attGAATTC TTAGGTCCAGAGGAGAGTGCCT. После этого проводилась рестрикция вставки и вектора, а также их лигирование.

Для создания конструкции анти-CD87-CAR использовалась плаزمид 9 c\_CAR1\_vPAX1, полученная в результате модификации lentiCRISPRv2 (Addgene plasmid #52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID:Addgene\_52961), любезно предоставленной Фэном Чжаном (Институт Эли и Эдит Л. Брод при Массачусетском технологическом институте и Гарварде, США), в которой проводилась замена нуклеазы Cas9 и пептида P2A на кассету CD19-CAR-T2A-FusionRed. В плазмиде 9 c\_CAR1\_vPAX1 заменялась последовательность анти-CD19-CAR на синтезированную компанией «Евроген» последовательность химерного антигенного рецептора к белку CD87 с добавленными сайтами рестрикции XbaI и BshTI. Последовательность анти-CD87-CAR



**Рис. 1.** Схема конструкции химерного антигенного рецептора (CAR), направленного против антигена CD87  
 α-human CD87 scFv — одноцепочечный варибельный фрагмент, специфичный для человеческого CD87; CD28 — шарнирно-трансмембранно-внутриклеточная область; CD3ζ — внутриклеточный домен; FusionRed — репортерный белок; h.CD8α — основной пептид Т-клеточного корецептора CD8, обеспечивающий транспорт белка на мембрану клетки; LTR — длинный терминальный повтор; T2A — пептид для бицистронной экспрессии; WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент для усиления экспрессии.

**Fig. 1.** Diagram of anti-CD87 chimeric antigen receptor (CAR) structure  
 α-human CD87 scFv — single-chain variable fragment specific to human CD87; CD28 — hinge-transmembrane-intracellular region; CD3ζ — intracellular domain; FusionRed — reporter protein; h.CD8α — leader peptide of T-cell CD8 co-receptor providing protein transport to the cell membrane; LTR — long terminal repeat; T2A — peptide for bicistronic expression; WPRE — post-transcriptional up-regulatory element.

взята из работы С. Amor и соавт. [8]. Проводилась рестрикция плазмиды и вставки по сайтам XbaI и BshTI с последующим лигированием. Полученная плазида anti\_CD87\_CAR состояла из гена анти-CD87-CAR, пептида T2A, обеспечивавшего бицистронную трансляцию, и репортерного белка FusionRed, обеспечивающего оценку эффективности трансдукции (рис. 1).

#### Получение лентивирусных частиц

В работе использовались любезно предоставленные Дженнифер Липпикотт-Шварц (Национальный институт здравоохранения Бетесда, США) pEGFP-VSVG (Addgene plasmid #11912; <http://n2t.net/addgene:11912>; RRID:Addgene\_11912) и Дидье Троно (Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария) psPAX2 (Addgene plasmid #12260; <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID:Addgene\_12260) плазмидные ДНК, кодирующие белок оболочки вируса и вирусные белки соответственно. Для получения лентивирусных частиц использовались клетки НЕК293Т. Из расчета на чашку размером 10 см в 1 мл бессывороточной среды Opti-MEM (Termofisher Scientific, США, 11058021) готовили две смеси для трансфекции. Смесь № 1: 10 мкг PsPax2, 4 мкг VSV-G, 10 мкг CD87\_PuroR\_pUltraHot\_Puro, 30 мкл PEI; смесь № 2: 10 мкг PsPax2, 4 мкг VSV-G, 10 мкг anti\_CD87\_CAR, 30 мкл PEI. Полученные смеси добавляли к клеткам НЕК293Т. Через 6 ч проводилась смена среды на бессывороточную Opti-MEM, содержащую 5 ммоль натрия бутирата, а через 24 ч супернатант собирался, центрифугировался при скорости 2000 g в течение 5–7 мин для осаждения клеток. Затем осветленный супернатант порциями переливался в центрифужные концентраторы Amicon Ultra-15 100 кДа (Millipore, Германия) и концентрировался центрифугированием при скорости 3000 g по 15 мин. После этого трижды осуществлялось промывание путем добавления в концентратор PBS (Millipore, Германия) и центрифугирования со скоростью 3000 g в течение 15 мин. После промывки проводился отбор сконцентрированного вируса в фалькон.

Далее проводилось титрование вируса. Для этого на 12-луночные планшеты были посеяны клетки НЕК293Т в количестве 50 000 на лунку. Через 4 ч к клеткам добавляли протамина сульфат до конечной

концентрации 50 мкг/мл и вносили вирусные частицы в следующих количествах на лунку планшета: 0,1, 1, 5, 10, 20, 50 и 100 мкл. Клетки помещались в инкубатор, через 24 ч проводилась смена среды (без протамина сульфата). Через 48 ч клетки анализировались с помощью проточного цитометра и был рассчитан титр вируса по формуле:  $T = N \times P / V$  (где  $T$  — титр,  $N$  — количество посеянных клеток,  $V$  — объем добавленного вирусного супернатанта,  $P$  — доля трансдуцированных клеток). Поскольку в векторе CD87\_PuroR\_pUltraHot\_Puro отсутствовал репортерный белок, расчет вирусного титра не проводился. Однако титр был рассчитан для вирусных частиц, содержащих плазмиду anti\_CD87\_CAR:  $T = 10^6$  частиц/мл.

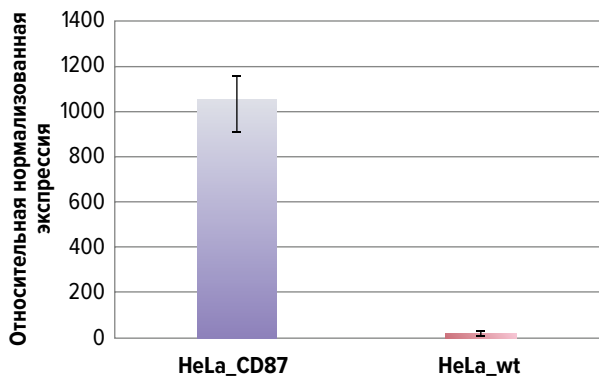
#### Трансдукция клеток с помощью лентивирусного вектора

Лентивирусной трансдукции подвергались клетки HeLa (спустя три пересева после разморозки) и Т-лимфоциты (спустя 48 ч после выделения и активации в условиях множественности заражения, равной 10). Трансдукция проводилась путем добавления к клеткам смеси концентрированных вирусных частиц и раствора протамина сульфата конечной концентрации 50 мкг/мл в полной ростовой среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). Спустя 6 ч после трансдукции Т-лимфоцитам и клеткам HeLa проводилась замена среды, а через 48 ч клетки HeLa высевались на чашки, содержащие среду с пуромицином в концентрации 5 мкг/мл. Клетки HeLa культивировали в данных условиях в течение 5 дней, затем антибиотик удаляли из среды для культивирования.

После прохождения селекции и достижения 90 % моноклональные клетки анализировались на экспрессию трансгена методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Через 48 ч после трансдукции Т-лимфоцитов выполнялся анализ эффективности трансдукции с помощью проточной цитометрии.

#### Анализ экспрессии CD87 методом количественной ПЦР

Для проведения ПЦР в реальном времени использовался набор qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). В качестве референсного гена был выбран *GAPDH*. Дизайн



**Рис. 2.** Результаты ПЦР:

HeLa\_CD87 — уровень экспрессии CD87 в трансдуцированных клетках; HeLa\_wt — уровень экспрессии CD87 в нетрансдуцированных клетках

**Fig. 2.** PCR results:

HeLa\_CD87 — CD87 expression level in transduced cells; HeLa\_wt — CD87 expression level in non-transduced cells

праймеров для амплификации CD87 был следующим: F<sub>20</sub> для aatGCTAGCATGGGTCAACCGCCGC, R<sub>20</sub> для attGAATTC TTAGGTCCAGAGGAGAGTGCCT. Дизайн праймеров для амплификации GAPDH: F<sub>20</sub> для CCGCATCTTCTTTTGCCTCG, R<sub>20</sub> для GCCCAATACGACCAATCCGT.

### Проточная цитометрия

Трансдуцированные лимфоциты анализировались на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Нетрансдуцированные лимфоциты использовались для калибровки прибора. CAR T-клетки инкубировались с антителами DuraClone IM T Cell Subsets Tube (Beckman Coulter, США), мечеными флуоресцентными белками, в соответствии с рекомендациями производителя.

### Имуноферментный анализ

Для определения концентрации интерферона-γ (IFN-γ), выделяемого Т-клетками при сокультивировании с мишенями, использовался набор «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия). Иммуноферментный анализ (ИФА) выполнялся в соответствии с протоколом производителя. Анализируемые образцы были рассеяны в количестве 25 000/лунка (клетки HeLa\_wt, HeLa\_CD87, Т-лимфоциты, CAR Т-лимфоциты). Как HeLa\_wt, так и HeLa\_CD87 были инкубированы с Т- и CAR Т-лимфоцитами, взятыми в количестве 50 000/лунка.

Оценка результатов ИФА проводилась с использованием спектрофотометра вертикального сканирования при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 655 нм. По полученным данным выполнено построение в линейных координатах калибровочного графика зависимости среднего арифметического значения оптической плотности в калибровочных образцах от концентрации IFN-γ и определение концентрации IFN-γ в контрольном и анализируемых образцах.

### Оценка цитотоксической активности CAR Т-лимфоцитов *in vitro*

Для оценки цитотоксических свойств CAR Т-лимфоцитов использовалась система анализа клеток в

реальном времени xCELLigence Biosensor RTCA (Agilent Technologies, США). Трансдуцированные (HeLa\_CD87) и немодифицированные клетки (HeLa\_wt) были рассеяны в лунки микротитровальных пластин в количестве 25 000/лунка. Спустя 22 ч к ним добавлялись Т- и CAR Т-лимфоциты в количестве 50 000/лунка. Относительно точки добавления лимфоцитов был нормализован клеточный индекс (в данной точке времени он равен единице). В качестве контроля были взяты клетки HeLa без добавления эффекторов.

### Статистический анализ

Для статистического анализа данных использовался непараметрический критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считались различия между выборками ( $n = 3$ ) при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Уровень экспрессии CD87 в трансдуцированных клетках HeLa

Согласно результатам ПЦР в реальном времени, полученная клеточная линия HeLa экспрессирует антиген CD87 в 1000 раз больше, чем немодифицированная клеточная линия (рис. 2).

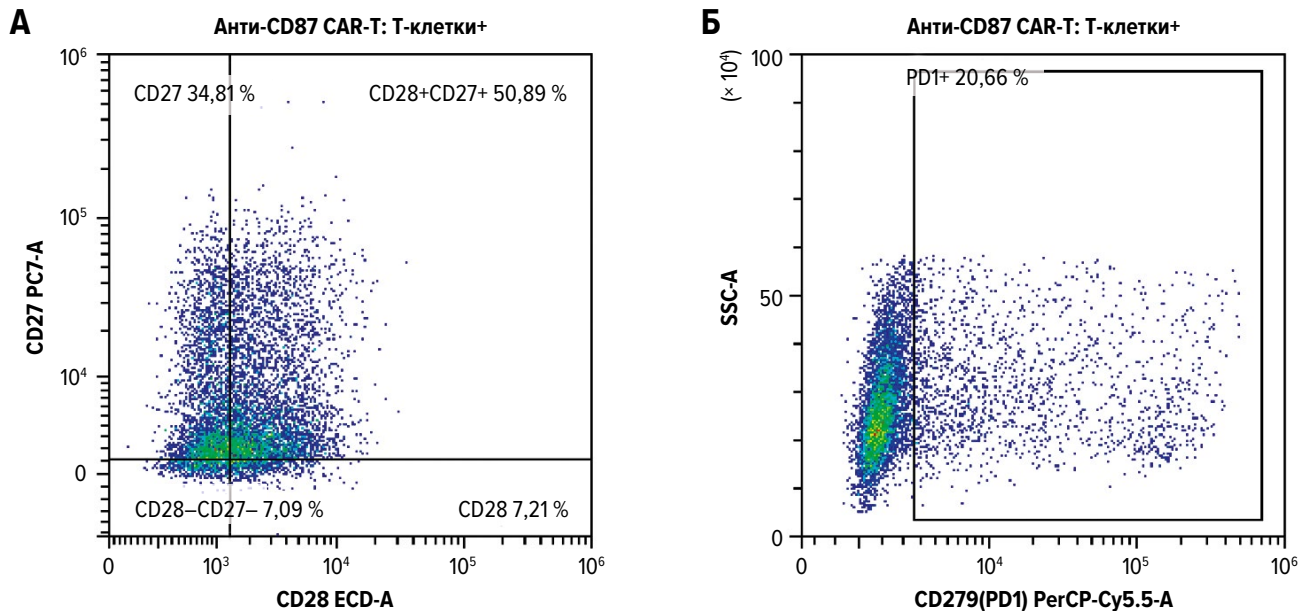
### Эффективность трансдукции CAR Т-лимфоцитов

Методом лентивирусной трансдукции получены анти-CD87 CAR Т-лимфоциты с эффективностью трансдукции 8,4 %. Невысокое значение эффективности трансдукции, вероятно, связано с недостаточным количеством вирусных частиц, добавляемых к Т-клеткам.

### Субпопуляционный состав CAR Т-лимфоцитов

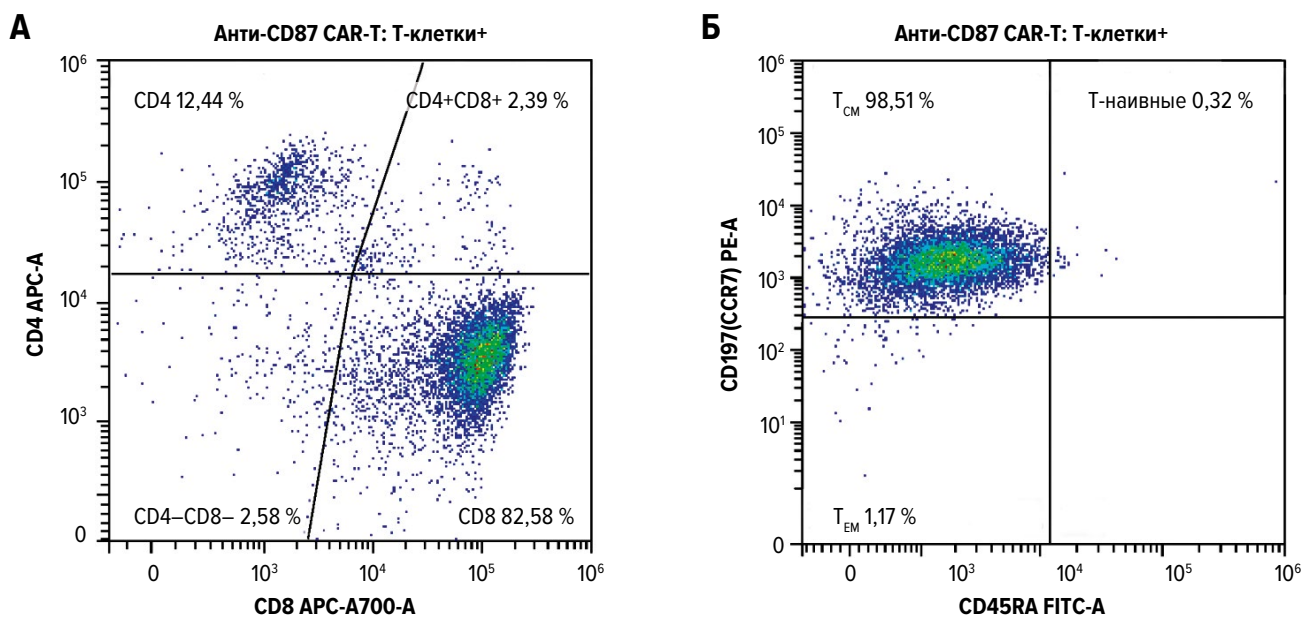
Анализируемые на проточном цитометре после инкубации с антителами CAR Т-клетки имеют маркеры активации CD27 и CD28, что определяет их эффективную работу по лизису клеток-мишеней. Однако наблюдается повышение экспрессии (20,66 %) маркера истощения CD279 (PD1), который может блокировать передачу сигнала с химерного антигенного рецептора, тем самым снижая эффективность Т-клеточного иммунного ответа при взаимодействии с мишенями (рис. 3).

Известно, что персистенция CAR Т-продукта и общая эффективность терапии с использованием CAR Т-клеток коррелируют с наличием менее дифференцированных субпопуляций Т-клеток как CD8+, так и CD4+ в конечном продукте [24]. В частности, было показано, что экспансия Т-клеток с CAR, направленным на антиген CD19, зависит от процентного соотношения наивных Т-клеток и клеток-предшественниц Т-клеток памяти [23]. В нашей работе 98,51 % полученных CAR Т-клеток имели фенотип Т-клеток центральной памяти (рис. 4). На основании этих данных мы можем сделать вывод о необходимости получения более разнообразного по фенотипам Т-клеточного состава конечного продукта, что можно достичь путем модуляции среды для культивирования [23]. Например, можно использовать другой биореактор или культивировать Т-лимфоциты в чашках; наряду с



**Рис. 3.** Влияние CAR T-лимфоцитов на экспрессию поверхностных маркеров: А — активация (CD27, CD28); Б — истощение (CD279)

**Fig. 3.** Surface marker expression depending on CAR-T lymphocytes: А — activation (CD27, CD28); Б — exhaustion (CD279)



**Рис. 4.** Анализ субпопуляционного состава CAR T-лимфоцитов: А — экспрессия CD4 и CD8; Б — экспрессия CD197 и CD45RA  
T<sub>CM</sub> — T-клетки центральной памяти; T<sub>EM</sub> — T-клетки эффекторной памяти.

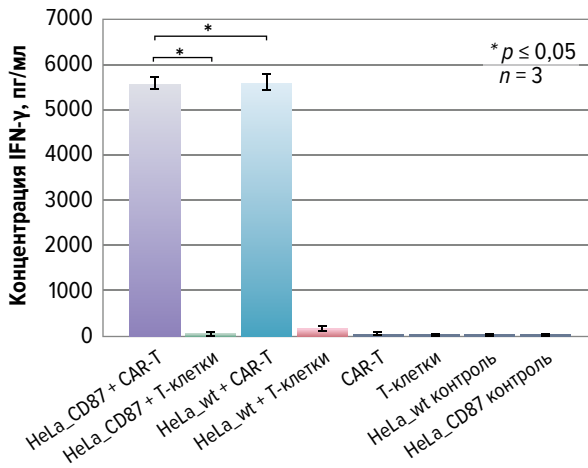
**Fig. 4.** Analysis of CAR-T lymphocyte subpopulation pattern: А — CD4 and CD8 expression; Б — CD197 and CD45RA expression  
T<sub>CM</sub> — central memory T-cells; T<sub>EM</sub> — effector memory T-cells.

интерлейкином-2 (IL-2) использовать IL-7 и IL-15 при культивировании.

Таким образом, значительная доля CAR T-лимфоцитов имеет маркер истощения PD1, что вместе с фенотипом, указывающим на более дифференцированное состояние Т-клеток, и меньшим количеством Т-хелперов по сравнению с Т-киллерами (1:7 соответственно) позволяет предсказывать снижение качества работы клеточного препарата *in vivo*.

### Определение концентрации IFN-γ, секретируемого CAR T-лимфоцитами

С помощью ИФА определена концентрация IFN-γ в среде после сокультивирования CAR T-лимфоцитов с клетками HeLa. Так, анти-CD87 CAR T-клетки продуцируют в 33–57 раз больше IFN-γ, чем Т-лимфоциты, при инкубации с мишенями и в 1100–1400 раз больше, чем Т- и CAR T-лимфоциты, не сокультивированные с клетками-мишенями (рис. 5).



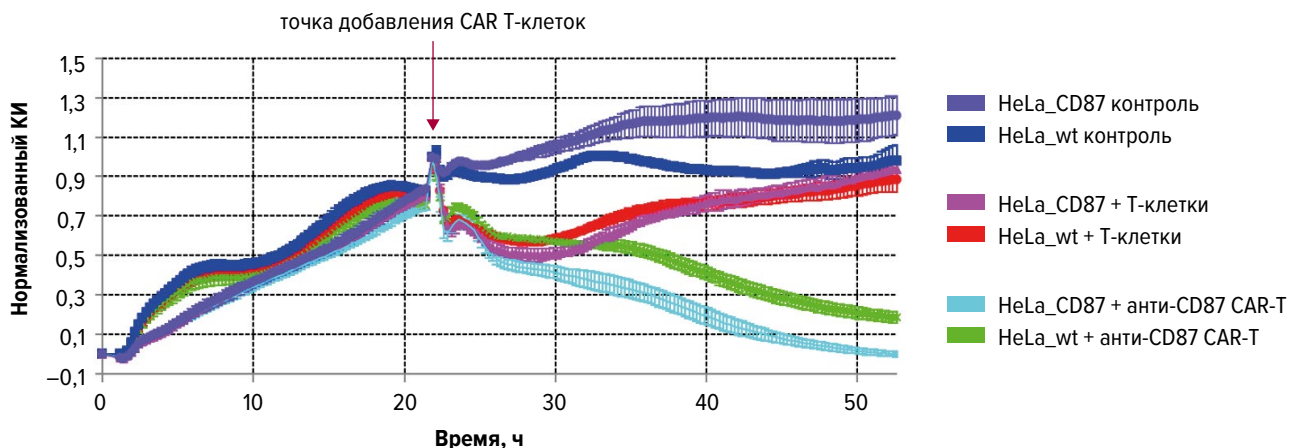
**Рис. 5.** Результаты иммуноферментного анализа: 1–4 — концентрация интерферона-γ (IFN-γ) в среде после со-культивирования Т- и CAR Т-лимфоцитов с клетками-мишенями; 5–8 — концентрация IFN-γ в среде контрольных образцов

**Fig. 5.** Immunoassay results: 1–4 — interferon-γ (IFN-γ) concentration in the medium after T- and CAR-T lymphocyte co-cultivation with target cells; 5–8 — IFN-γ concentration in the medium of control samples

Полученные данные позволяют сделать вывод, что CAR Т-клетки демонстрируют специфическое высвобождение IFN-γ при взаимодействии с целевым антигеном CD87, находящимся на поверхности атакуемых клеток.

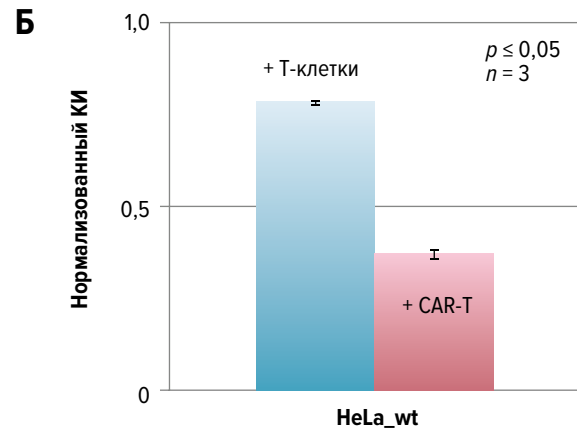
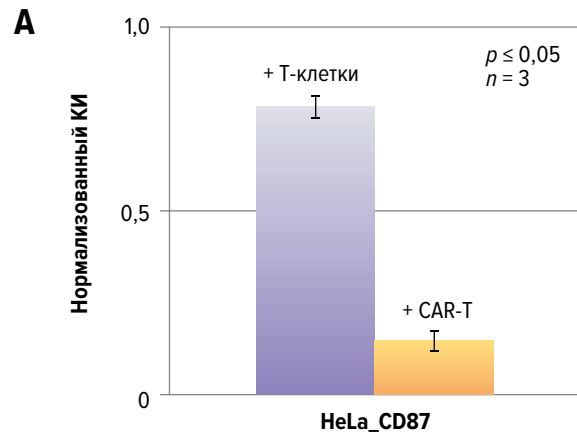
**Цитотоксическая активность CAR Т-лимфоцитов in vitro**

По результатам тестирования цитотоксичности в реальном времени видно, что до добавления лимфоцитов клеточный индекс всех анализируемых образцов увеличивался, поскольку происходила адгезия к микроэлектродам клеток HeLa и их пролиферация. После добавления Т-лимфоцитов клеточный индекс продолжал расти для контрольных образцов и клеток HeLa, к которым добавлялись Т-лимфоциты, поскольку клетки HeLa продолжали пролиферировать. В случае добавления CAR Т-лимфоцитов клеточный индекс уменьшался, т. к. происходил лизис мишеней (рис. 6).



**Рис. 6.** Изменение клеточного индекса (КИ) до и после добавления CAR Т-клеток и Т-лимфоцитов к клеткам-мишеням

**Fig. 6.** Changes in cell index (КИ) before and after CAR-T cell and T-lymphocyte addition to target cells



**Рис. 7.** (А, Б) Сравнительные диаграммы цитотоксичности CAR Т-клеток и Т-лимфоцитов через 20 ч после добавления к клеткам-мишеням на основании изменения клеточного индекса (КИ)

**Fig. 7.** (А, Б) Comparison charts of CAR-T cell and T-lymphocyte cytotoxicity 20 hours after their addition to target cells based on cell index (КИ) changes

Полученные CAR Т-лимфоциты по сравнению с нетрансдуцированными Т-лимфоцитами проявляют специфическую и выраженную спустя 20 ч цитотоксичность в отношении мишеней CD87+ из обеих клеточных линий HeLa (рис. 7).

При сравнении воздействия CAR Т-лимфоцитов на гиперэкспрессию CD87 и на немодифицированные

клетки HeLa наблюдается разница лишь в эффективности цитотоксичности, а качественно результат не отличается (CAR T-лимфоциты лизируют клетки из обеих линий) (рис. 8).

Однако, учитывая, что экспрессия CD87 в трансдуцированных и не подвергшихся трансдукции клетках HeLa отличалась в 1000 раз, можно предположить наличие цитотоксического воздействия на здоровые клетки *in vivo*, т. к. цитотоксичность анти-CD87 CAR T-лимфоцитов не коррелирует линейно с плотностью антигена CD87 на поверхности клеток-мишеней.

## ОБСУЖДЕНИЕ

CD87 — многофункциональный поверхностный белок, активно участвующий в прогрессировании множества заболеваний. Маркер CD87 имеет потенциал стать универсальной мишенью для адоптивной иммунотерапии многих типов опухолей. Анти-CD87 CAR T-лимфоциты могут использоваться в качестве противоопухолевого препарата для терапии ОМЛ ввиду высокой экспрессии антигена на опухолевых клетках. Что касается экспрессии CD87 в здоровых тканях человека, она наиболее выражена в клетках костного мозга (миеломоноцитарные предшественники: миелобласты, монобласты или промоноциты; гранулоциты; моноциты и макрофаги; активированные NK-клетки) за исключением T- и B-лимфоцитов и гемопоэтических стволовых клеток [17, 19]. Помимо перечисленных выше клеток cPAR обнаружен на поверхности эндотелиоцитов, фибробластов, мышечных клеток и клеток многих солидных опухолей [17].

Полученные CAR T-лимфоциты с использованием химерного антигенного рецептора, состоящего из антигенраспознающего домена, который образован фрагментами переменных цепей антитела, связанных коротким линкерным пептидом, сигнал-проводящего активационного (CD3 $\zeta$ ) и костимулирующего (CD28) доменов, обладают ярко выраженной и специфической цитотоксичностью к клеткам-мишеням, экспрессирующим CD87. Эффективность цитотоксической активности, по полученным данным, коррелирует с уровнем экспрессии антигена, но не имеет линейной зависимости от нее. При этом минимальный уровень экспрессии CD87, необходимый для элиминации опухоли и позволяющий оценить вероятность цитотоксического воздействия на здоровые клетки, не был определен. Ввиду доказанной цитотоксичности *in vitro* изученный CAR T-препарат нуждается в обязательном уточнении предыдущего положения для оценки профиля безопасности *in vivo*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Недавно опубликованные данные относительно клинических исследований рецептора NKG2D показали отсутствие объективных реакций опухолевых клеток, за исключением временного улучшения гематологических параметров у 1 пациента с ОМЛ при самой высокой дозировке, и случаев стабилизации заболевания [25]. В соответствии с предшествующими

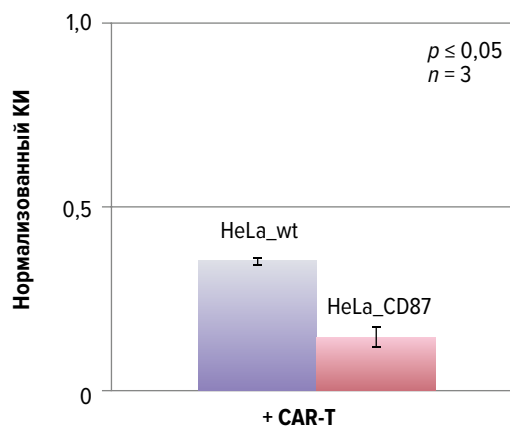


Рис. 8. Клеточный индекс (КИ) через 20 ч после добавления к клеткам-мишеням CAR T-лимфоцитов

Fig. 8. The cell index (КИ) 20 hours after CAR-T lymphocyte addition to target cells

экспериментами на мышиных моделях, требующих повторных инфузий клеток, которые экспрессируют рецептор NKG2D, для полной элиминации опухоли, у большинства пациентов персистенция NKG2D CAR T-клеток была невысокой [26]. Исходя из имеющихся данных, мы можем сделать вывод, что создание T-лимфоцитов, экспрессирующих CAR к антигену CD87, подобно клеткам с химерным антигенным рецептором NKG2D, лиганды которого также могут экспрессироваться на клетках здоровых тканей, требует наличия дополнительного регуляторного механизма, повышающего их специфичность и, как следствие, безопасность при применении *in vivo*.

В данном контексте мы можем обратиться к уже прошедшей апробацию модели биспецифических CAR T-клеток с регулируемой экспрессией химерного антигенного рецептора. При использовании такого подхода связывание с целевым антигеном первого рецептора, постоянно экспрессирующегося на поверхности CAR T-клеток, не запускает их активацию, а индуцирует расщепление рецептора и высвобождение домена SynNotch, который, в свою очередь, проникает в ядро и активирует транскрипцию второго рецептора [27]. Такой подход обеспечивает высокоспецифичное распознавание опухолевых клеток.

Кроме того, представляет интерес стратегия использования ключевых особенностей микроокружения опухоли, которые, в частности, связаны с истощением питательных веществ, низким внеклеточным pH (ацидозом) и низкой оксигенацией (гипоксией) [28]. В недавней работе по созданию регулируемых CAR T-лимфоцитов, экспрессия химерного антигенного рецептора, с одной стороны, контролировалась тандемными повторами из гена эритропоэтина человека, активирующими экспрессию химерного рецептора в условиях гипоксии. С другой стороны, C-конец цитоплазматического домена CAR — CD3 $\zeta$  был шит с доменом от HIF-1 $\alpha$  (фактора, индуцируемого гипоксией 1 $\alpha$ ), вызывающим убиквитинирование и последующую деградацию белка при нормоксии [29]. Таким образом, была получена система с двойным контролем активации CAR T-лимфоцитов, обеспечивающая их работу только в микроокружении опухоли.



Резюмируя все вышесказанное, можно сделать вывод о возможности успеха использования адоптивной иммунотерапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором к антигену CD87 с дополнительной системой регуляции CAR Т-лимфоцитов, повышающей их специфичность и безопасность.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-901 от 20.04.2020 г.).

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** М.В. Неклесова.

**Сбор и обработка данных:** М.В. Неклесова, К.А. Левчук.

**Анализ и интерпретация данных:** С.В. Смирнов, К.А. Левчук, М.В. Неклесова, А.Е. Ершова.

**Подготовка рукописи:** М.В. Неклесова, С.В. Смирнов, А.А. Шатилова.

**Окончательное одобрение рукописи:** С.А. Силонов.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Stoppelli MP, Corti A, Soffientini A, et al. Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(15):4939–43. doi: 10.1073/pnas.82.15.4939.
2. Behrendt N, Ronne E, Dano K. The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376(5):269–79.
3. Кугаевская Е.В., Гуреева Т.А., Тимошенко О.С., Соловьева Н.И. Система активатора плазминогена урокиназного типа в норме и при жизнеугрожающих процессах (обзор). *Общая реаниматология*. 2018;14(6):61–79. doi: 10.15360/1813-9779-2018-6-61-79. [Kugaevskaya EV, Gureeva TA, Timoshenko OS, Solovyeva NI. Urokinase-type plasminogen activator system in norm and in life-threatening processes (Review). *General Reanimatology*. 2018;14(6):61–79. doi: 10.15360/1813-9779-2018-6-61-79. (In Russ)]
4. Mahmood N, Mihalciu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol*. 2018;8(2):8–24. doi: 10.3389/fonc.2018.00024.
5. Alfano D, Gorrasi A, Li Santi A, et al. Urokinase receptor and CXCR4 are regulated by common microRNAs in leukaemia cells. *J Cell Mol Med*. 2015;19(9):2262–72. doi: 10.1111/jcmm.12617.
6. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):23–36. doi: 10.1038/nrm2821.

7. Gorantla B, Asuthkar S, Rao JS, et al. Suppression of the uPAR-uPA system retards angiogenesis, invasion, and in vivo tumor development in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2011;9(4):377–89. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0452.
8. Amor C, Feucht J, Leibold J, et al. Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature*. 2020;583(7814):127–32. doi: 10.1038/s41586-020-2403-9.
9. Kusch A, Gulba D. Die Bedeutung des uPA/uPAR-Systems für die Entwicklung von Arteriosklerose und Restenose. *Z Kardiol*. 2001;90(1):307–18. doi: 10.1007/s003920170160.
10. Laurenzana A, Chilla A, Luciani C, et al. uPA/uPAR system activation drives a glycolytic phenotype in melanoma cells. *Int J Cancer*. 2017;141(6):1190–200. doi: 10.1002/ijc.30817.
11. Ahmad A, Kong D, Sarkar SH, et al. Inactivation of uPA and its receptor uPAR by 3,3'-diindolylmethane (DIM) leads to the inhibition of prostate cancer cell growth and migration. *J Cell Biochem*. 2009;107(3):516–27. doi: 10.1002/jcb.22152.
12. Fox SB, Taylor M, Grondahl-Hansen J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. *J Pathol*. 2001;195(2):236–43. doi: 10.1002/path.931.
13. Fisher JL, Field CL, Zhou H, et al. Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases – a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;61(1):1–12. doi: 10.1007/s10549-004-6659-9.
14. Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, et al. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2005;114(2):291–8. doi: 10.1002/ijc.20698.
15. Hildenbrand R, Schaaf A, Dorn-Beineke A, et al. Tumor stroma is the predominant uPA-, uPAR-, PAI-1-expressing tissue in human breast cancer: prognostic impact. *Histol Histopathol*. 2009;24(7):869–77. doi: 10.14670/HH-24.869.
16. Boonstra MC, Verbeek FP, Mazar AP, et al. Expression of uPAR in tumor-associated stromal cells is associated with colorectal cancer patient prognosis: a TMA study. *BMC Cancer*. 2014;14:269. doi: 10.1186/1471-2407-14-269.
17. Graf M, Reif S, Hecht K, et al. High expression of urokinase plasminogen activator receptor (UPA-R) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with worse prognosis. *Am J Hematol*. 2005;79(1):26–35. doi: 10.1002/ajh.20337.
18. Plesner T, Raifkiaer E, Wittrup M, et al. Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. *Am J Clin Pathol*. 1994;102(6):835–41. doi: 10.1093/ajcp/102.6.835.
19. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia*. 2004;18(3):394–400. doi: 10.1038/sj.leu.2403250.
20. Cummins KD, Gill S. Will CAR T cell therapy have a role in AML? Promises and pitfalls. *Semin Hematol*. 2019;56(2):155–63. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.008.
21. Kramer MD, Spring H, Todd RF, et al. Urokinase-type plasminogen activator enhances invasion of human T cells (Jurkat) into a fibrin matrix. *J Leukoc Biol*. 1994;56(2):110–6. doi: 10.1002/jlb.56.2.110.
22. Bianchi E, Ferrero E, Fazioli F, et al. Integrin-dependent induction of functional urokinase receptors in primary T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1996;98(5):1133–41. doi: 10.1172/JCI118896.
23. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*. 2014;123(24):3750–9. doi: 10.1182/blood-2014-01-552174.
24. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*. 2016;30(2):492–500. doi: 10.1038/leu.2015.247.
25. Baumeister SH, Murad J, Werner L, et al. Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(1):100–12. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0307.
26. Barber A, Meehan KR, Sentman CL. Treatment of multiple myeloma with adoptively transferred chimeric NKG2D receptor-expressing T cells. *Gene Ther*. 2011;18(5):509–16. doi: 10.1038/gt.2010.174.
27. Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*. 2016;164(4):770–9. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.011.
28. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):437–47. doi: 10.1038/nrc1367.
29. Kosti P, Larios-Martinez KI, Maher J, Arnold JN. Generation of hypoxia-sensing chimeric antigen receptor T cells. *STAR Protoc*. 2021;2(3):100723. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100723.