

УДК 571.27

СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НК-КЛЕТОК ПРИ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ С ЦЕЛЬЮ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

© 2023 г. М. А. Стрельцова¹, А. А. Бойко¹, М. О. Устюжанина^{1,2}, А. И. Паламарчук¹,
Н. А. Алексеева¹, Р. А. Величинский¹, Ю. Д. Вавилова¹, М. В. Гречихина¹,
А. М. Сапожников¹, академик РАН С. М. Деев^{1,3}, Е. И. Коваленко^{1,*}

Поступило 10.10.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принято к публикации 14.10.2022 г.

Получение генно-инженерных НК-клеток является одним из развивающихся направлений иммунотерапии. В данной работе проведен анализ субпопуляционной гетерогенности НК-клеток, подвергнутых ретровирусной трансдукции с учетом содержания предшественников адаптивных НК-клеток. Показано, что субпопуляции KIR2DL2/DL3⁺, а также CD57-KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺ могут быть модифицированы с большей эффективностью, чем соответствующие субпопуляции, не несущие маркеров KIR2DL2/DL3 и NKG2C. После генетической модификации клетки с фенотипом CD57-KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺ начинали экспрессировать CD57 *de novo*, приобретая типичный для адаптивных НК-клеток фенотип.

Ключевые слова: НК-клетки, иммунотерапия, модификация, трансдукция, адаптивные НК-клетки, пролиферативный потенциал, чувствительность к модификации

DOI: 10.31857/S2686738922700068, **EDN:** MVBLMI

В настоящее время использование генетически модифицированных НК-клеток является перспективной стратегией противоопухолевой иммунотерапии [1]. Однако на пути реализации этой стратегии необходимо преодолеть ряд проблем [2], в частности, получить возможность наработки требуемого количества трансдуцированных НК-клеток. Существует множество субпопуляций НК-клеток, которые могут различаться по пролиферативному потенциалу и восприимчивости к генетической вирусной трансдукции [3]. Поиск сочетания субпопуляционных НК-клеточных маркеров, способных предсказать полу-

чение большего количества трансдуцированных НК-клеток, является актуальной биологической задачей. Использование в иммунотерапии адаптивных НК-клеток, способных атаковать клетки-мишени при повторной встрече с антигенами цитомегаловируса человека (HCMV), представляет перспективным подходом к решению указанной задачи, поскольку такие клетки, наряду с противоопухолевым действием, могут помочь в сдерживании реактивации персистирующего у большинства пациентов вируса HCMV [4]. Типичные адаптивные НК-клетки являются высокодифференцированными, CD57-позитивными, NKG2A-негативными и несут на поверхности рецепторы семейства KIR [5]. Известно, что в процессе дифференцировки НК-клетки, начинающие экспрессировать ингибирующие рецепторы KIR, приобретают “лицензию” на выполнение цитотоксических функций путем распознавания главного комплекса гистосовместимости класса I [6]. Использование субпопуляций адаптивных НК-клеток, прошедших стадию “лицензирования”, может повысить иммунотерапевтическую эффективность НК-клеток. Целью данной работы являлось изучение субпопуляционной гетеро-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: lenkovalen@mail.ru

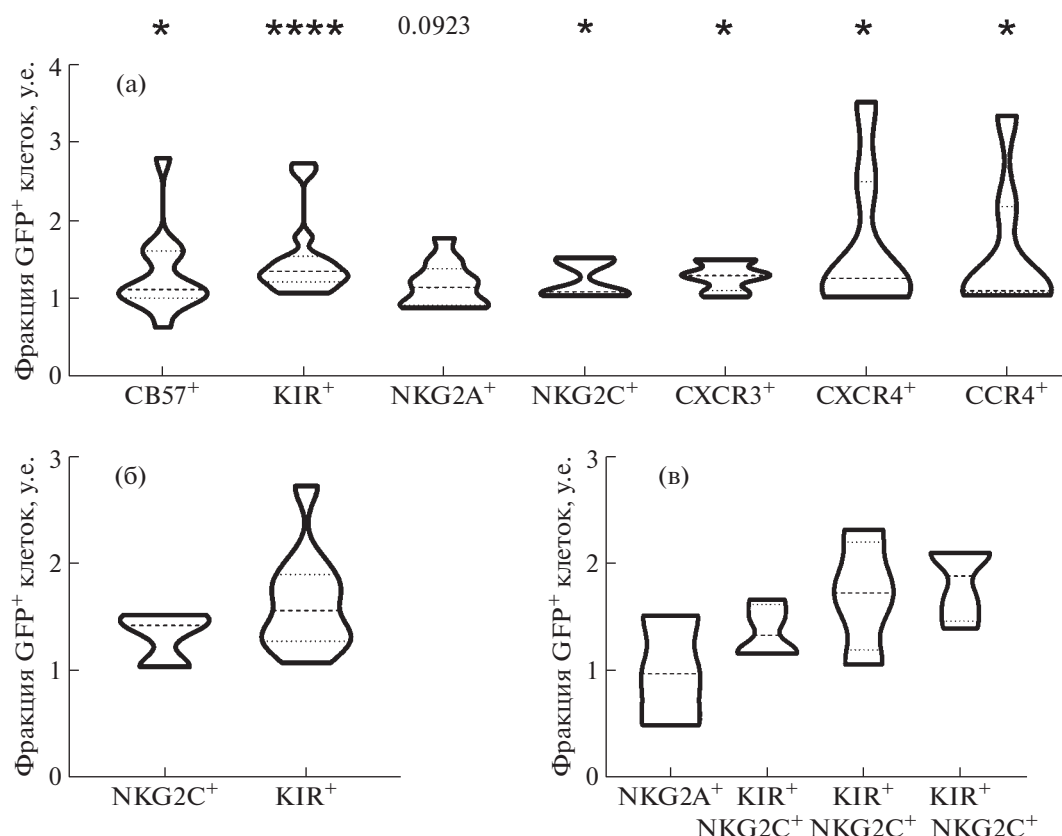


Рис. 1. Сравнение эффективности заражения вирусными частицами различных субпопуляций NK-клеток, измеренное по уровню флуоресценции репортерного белка GFP через 7 дней после процедуры трансдукции. Статистический анализ был проведен с использованием парного Т-теста. (а, б) – Данные нормализованы на уровень экспрессии GFP в соответствующей негативной субпопуляции (у.е. – условные единицы), (а) – данные получены методом гейтирования клеток, $n = 16$. (б, в) – данные по экспрессии GFP получены на клетках, выделенных методом сортировки, (б) – $n = 8$, (в) – $n = 4$.

генности NK-клеток при проведении генетической модификации.

Образцы венозной крови были забраны у здоровых доноров, давших устное информированное согласие на участие в исследовании. Популяцию NK-клеток выделяли с помощью магнитной сепарации из фракции мононуклеаров. Для стимуляции NK-клеток использовали методику культивирования *in vitro* с IL-2 и предварительно облученными модифицированными фидерными клетками K562-mbIL21 [7]. Для модификации использовали ретровирусные частицы, несущие на поверхности белок RD114. Эффективность трансдукции измеряли по уровню экспрессии репортерного белка GFP методом проточной цитофлуориметрии. В работе были проанализированы NK-клетки 16 здоровых добровольцев.

После стимуляции *in vitro* в течение 7 дней большинство NK-клеток экспрессировали маркер активации HLA-DR. Полученные культуры имели низкое содержание клеток CD57+ и повышенное NKG2A+, что характерно для слабодиф-

ференцированных NK-клеток. Большая часть NK-клеток экспрессировала также активирующие рецепторы CD16 и NKp30. Вместе с низким уровнем CD57 у части стимулированных клеток наблюдалась значительная экспрессия активирующего рецептора NKG2C, маркера специализированной субпопуляции NK-клеток – адаптивных NK-клеток. Предположительно NK-клетки CD57-NKG2C+ избирательно пролиферировали в ответ на использованные стимулы. Однако мы не исключаем возможность частичной потери экспрессии CD57 NK-клетками с исходным фенотипом NKG2C+CD57+, так как на клональном уровне было показано, что высокодифференцированные NK-клетки CD57^{bright} могут утрачивать экспрессию CD57 [8].

Данные по эффективности трансдукции NK-клеток были получены через 7 дней после их заражения вирусными частицами с использованием проточной цитометрии и последующего гейтирования. Так как после трансдукции большинство NK-клеток экспрессировало активирующие ре-

цепторы CD2, CD16, NKG2D и маркер активации HLA-DR, сравнение уровня трансдукции в субпопуляциях, различающихся по экспрессии указанных маркеров, не проводилось.

Поскольку миграционный потенциал НК-клеток в опухоль в значительной степени регулируется хемокинами [9], нами была проведена оценка эффективности трансдукции НК-клеток, экспрессирующих различные хемокиновые рецепторы. Повышенный уровень трансдукции был выявлен у НК-клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3, CXCR4 и CCR7 (рис. 1а).

Ранее нами была продемонстрирована низкая эффективность трансдукции отсортированных НК-клеток с фенотипом CD57⁺ [10]. Однако при модификации общей популяции НК-клеток большее процентное содержание GFP-позитивных клеток было зарегистрировано в субпопуляции CD57⁺ (рис. 1а) по сравнению с CD57-негативной субпопуляцией. По-видимому, это связано с увеличением экспрессии CD57 НК-клетками после процедуры трансдукции. В то же время увеличенная эффективность ретровирусной модификации была выявлена во фракции НК-клеток с фенотипом NKG2C⁺ (рис. 1а).

Большее процентное содержание GFP⁺ клеток наблюдалось в субпопуляции KIR2DL2/DL3⁺ (KIR⁺) по сравнению с KIR-негативной (рис. 1А). Причиной выявленного различия может быть как более высокая скорость пролиферации KIR⁺НК-клеток после процедуры трансдукции, так и лучшая восприимчивость KIR⁺НК-клеток к ретровирусной модификации. Для выяснения причины указанных различий свежeweделенные НК-клетки были поделены на фракции KIR⁺ и KIR⁻ с помощью клеточной сортировки, простимулированы и подвергнуты ретровирусной трансдукции по вышеописанной методике. Анализ данных показал значительное увеличение эффективности заражения отсортированных НК-клеток субпопуляции KIR⁺, по сравнению с отсортированными НК-клетками из субпопуляции KIR⁻ (рис. 1б). Так как после 7-дневного культивирования трансдуцированных клеток не наблюдалось увеличения доли GFP⁺ в субпопуляции KIR⁺, гипотеза о более высокой скорости пролиферации модифицированных НК-клеток с фенотипом KIR⁺ была исключена. Это позволило сделать вывод о существовании связи между эффективностью трансдукции НК-клеток и уровнем поверхностной экспрессии рецепторов KIR.

Часть НК-клеток с фенотипом CD57⁻NKG2A⁻NKG2C⁺ обладает чертами адаптивных НК-клеток и может являться их предшественниками [11]. В данной работе CD57-негативные НК-клетки были отсортированы с учетом наличия на их поверхности рецепторов NKG2A, NKG2C и

KIR2DL2/3. Показано, что через 7 дней культивирования в субпопуляции CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ значительно большая доля клеток экспрессировала маркер CD57 *de novo* [12]. По-видимому, часть этих НК-клеток является адаптивными клетками, также характеризующимися наличием CD57. Было проведено сравнение эффективности трансдукции отсортированных субпопуляций KIR⁻NKG2C⁺, KIR⁺NKG2C⁻ и KIR⁺NKG2C⁺ (рис. 1В). Наибольшая восприимчивость к модификации зарегистрирована в клетках, полученных из субпопуляции KIR⁺NKG2C⁺.

Полученные данные послужат обоснованием к более четкому выбору субпопуляций НК-клеток для генетической модификации с целью их потенциального использования в таргетной противоопухолевой терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Минобрнауки № 075-15-2021-1049.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования с участием людей были рассмотрены и одобрены Российским национальным исследовательским медицинским университетом имени Пирогова. Участники предоставили устное информированное согласие на участие в этом исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy // Russian Chemical Reviews. 2022. V. 91. RCR5034.
2. Shipunova V.O., Deyev S.M. Artificial scaffold polypeptides as an efficient tool for the targeted delivery of nanostructures in vitro and in vivo // Acta Naturae. 2022. V. 14 (1). P. 54–72.
3. Yang C., Siebert J.R., Burns R., et al. Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome // Nature Communications. 2019. V. 10. P. 3931. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11947-7>
4. Hammer Q., Rückert T., Borst E.M., et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells // Nature Immunology. 2018. V. 19. P. 453–463.
5. Bezjat V., Liu L.L., Malmberg J.A., et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs // Blood. 2013. V. 121. P. 2678–2688.
6. Tu M.M., Mahmoud A.B., Makrigiannis A.P. Licensed and Unlicensed NK Cells: Differential Roles in Cancer and Viral Control // Frontiers in Immunology. 2016. V. 7. P. 166.
7. Denman C.J., Senyukov V. V., Somanchi S.S., et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo

- proliferation of human natural killer cells // PLoS One. 2012. V. 7. P. e30264.
8. *Streltsova M.A., Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., et al.* Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of “senescent” NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0208469.
 9. *Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.-G., et al.* Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition // Blood. 2010. V. 115. P. 2167–2176.
 10. *Streltsova M.A., Barsov E.V., Erokhina S.A., et al.* Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21 // Journal of Immunological Methods. 2017. V. 450. P. 90–94.
 11. *Kobyzeva P.A., Streltsova M.A., Erokhina S.A., et al.* CD56dimCD57–NKG2C+ NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57+NKG2C+ memory-like NK cells // Journal of Leukocyte Biology. 2020. V. 108. P. 1379–1395.
 12. *Pfefferle A., Jacobs B., Ask E.H., et al.* Intra-lineage Plasticity and Functional Reprogramming Maintain Natural Killer Cell Repertoire Diversity // Cell Reports. 2019. V. 29. P. 2284–2294.

SUBPOPULATION HETEROGENEITY OF NK CELLS DURING THE GENETIC MODIFICATION FOR SUBSEQUENT USE IN TARGETED THERAPY

**M. A. Streltsova^a, A. A. Boyko^a, M. O. Ustiuzhanina^{a,b}, A. I. Palamarchuk^a,
N. A. Alekseeva^a, R. A. Velichinskii^a, J. D. Vavilova^a, M. V. Grechikhina^a, A. M. Sapozhnikov^a,
Academician of the RAS S. M. Deev^{a,c}, and E. I. Kovalenko^{a,#}**

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: lenkovaen@mail.ru

Obtaining genetically engineered NK cells is one of the developing areas of immunotherapy. In this work, we analyzed the subset heterogeneity of NK cells subjected to retroviral transduction, taking into account the content of adaptive NK cell precursors. It has been shown that subpopulations of KIR2DL2/DL3⁺, as well as CD57–KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺, can be modified with greater efficiency than the corresponding subpopulations that do not carry the KIR2DL2/DL3 and NKG2C markers. After genetic modification, the CD57–KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺ cells began to express CD57 *de novo*, acquiring the adaptive NK cell phenotype.

Keywords: NK cells, immunotherapy, modification, transduction, adaptive NK cells, proliferative potential, sensitivity to modification