

# БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ БИОЛОГИЯ BIOLOGY AND MEDICAL BIOLOGY

## CAR НК-ТЕРАПИЯ: МЕТОДЫ АКТИВАЦИИ И ЭКСПАНСИИ НК-КЛЕТОК

### РЕЗЮМЕ

**Фёдорова П.О.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (105064, г. Москва, Малый Казенный пер., 5А, Россия)  
Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей, ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, Россия)  
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
**Фёдорова Полина Олеговна,**  
e-mail: ppolite@mail.ru

На сегодняшний день терапия Т-клетками с химерным рецептором антигена (CAR, chimeric antigen receptor) представляет собой эффективный метод лечения в области онкогематологических заболеваний. Однако иммунотерапия на основе Т-лимфоцитов имеет определённые недостатки, ограничивающие область применения данного подхода. Многообещающей альтернативой служит основанная на натуральных киллерах (НК-клетках) CAR-терапия, поскольку она не требует детального подбора донора по системе человеческих лейкоцитарных антигенов; НК-клетки обладают уникальным механизмом распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Кроме того, при инфузии натуральные киллеры не вызывают тяжёлых токсических реакций. Создание CAR НК-продукта представляет собой непростую задачу, включающую культивирование клеток, использование методов генной инженерии, а также проверку контроля качества полученного биомедицинского клеточного продукта (БМКП). Для пролиферации и усиления эффекторных функций НК-клеткам требуется наличие в питательной среде интерлейкинов, фидерных клеток или их компонентов и активаторов иммунной системы. В данном обзоре основное внимание уделяется различным подходам к активации и экспансии натуральных киллеров в процессе культивирования, а также затрагиваются вопросы о достоинствах и недостатках выбранного метода терапии и о регуляторных аспектах создания полноценного БМКП.

**Ключевые слова:** адаптивная иммунотерапия, химерные антигенные рецепторы, НК-клетки, фидерные клетки, интерлейкины, трансдукция

Статья поступила: 18.10.2023

Статья принята: 03.10.2024

Статья опубликована: 22.11.2024

**Для цитирования:** Фёдорова П.О. CAR НК-терапия: методы активации и экспансии НК-клеток. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 53-65. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.6

## CAR NATURAL KILLER CELL THERAPY: NATURAL KILLER CELL ACTIVATION AND EXPANSION

**Fedorova P.O.**

I.I. Mechnikov Vaccine and Serum  
Research Institute (Malyi Kazennyi lane 5A,  
Moscow 105064, Russian Federation)  
Research Institute of Experimental Therapy  
and Diagnostics of Tumor, N.N. Blokhin  
National Medical Center of Oncology  
(Kashirskoye Highway 24, Moscow 115522,  
Russian Federation)  
I.M. Sechenov First Moscow State  
Medical University (Sechenov University)  
(Trubetskaya str. 8-2, Moscow 119991,  
Russian Federation)

Corresponding author:  
**Polina O. Fedorova,**  
e-mail: ppolite@mail.ru

### ABSTRACT

Currently, chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy is an effective treatment method of hematological malignancies. However, T-lymphocyte-based immunotherapy has certain limitations for the scope of application of this approach. A promising alternative is CAR therapy based on natural killer (NK) cells, since it does not require detailed donor selection according to the human leukocyte antigen system; NK cells have a unique mechanism for recognizing and destroying tumor cells. In addition, NK cells do not cause severe toxic reactions when infused. The creation of a CAR NK product is a complex task includes cell culturing, using genetic engineering methods, and quality control testing of the resulting biomedical cell product (BMCP). For proliferation and effector function enhancement, NK cells require the presence of interleukins, feeder cells or their components, and immune system activators in the nutrient medium. This review focuses on various approaches to the activation and expansion of natural killer cells during cultivation, and also addresses the issues of the advantages and disadvantages of the chosen therapy and the regulatory aspects of creating a full-fledged BMCP.

**Key words:** adoptive immunotherapy, chimeric antigen receptors, natural killer cells, feeder cells, interleukins, transduction

Received: 18.10.2023

Accepted: 03.10.2024

Published: 22.11.2024

**For citation:** Fedorova P.O. CAR natural killer cell therapy: Natural killer cell activation and expansion. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 53-65. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.6

## РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ

Натуральные киллеры (НК) являются первой линией защиты организма от опухолевых или поражённых вирусами клеток. Они принимают важное участие в функционировании врождённого иммунитета и кооперации клеток иммунной системы. Человеческие НК-клетки представляют собой крупные гранулярные лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности CD56-рецептор, но не имеющие T-клеточного рецептора. Активация НК-клеток основана на сбалансированной системе, объединяющей сигналы от активирующих и ингибирующих рецепторов. У человека выделяют две субпопуляции натуральных киллеров: CD56<sup>bright</sup>CD94<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>/+NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> и CD56<sup>dim</sup>CD94<sup>med/low</sup>CD16<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>/-KIR<sup>+</sup> [1]. CD56<sup>bright</sup>CD94<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>/+NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> НК-клетки секретируют фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ), интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и различные интерлейкины (ИЛ); стимулируют воспаление, активируют дендритные клетки и презентруют антигены [1]. CD56<sup>dim</sup>CD94<sup>med/low</sup>CD16<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup>/-KIR<sup>+</sup>-клетки – более зрелая и многочисленная субпопуляция, обнаруживаемая в периферической крови и костном мозге. Эти клетки проявляют в основном цитотоксические свойства, воздействуя на инфицированные, повреждённые или опухолевые клетки посредством высвобождения литических гранул или вызывая антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) [2].

Секреция IFN- $\gamma$  активированными НК-клетками вызывает множество физиологических эффектов, имеющих особое значение при опухолевом процессе, поскольку IFN- $\gamma$  ингибирует опухолевый ангиогенез, проявляет антиметастатическую активность и вызывает апоптоз [3]. Способность опухолевых клеток ингибировать иммунный ответ является основной предпосылкой образования и прогрессирования опухолевых новообразований. Постепенно опухоли претерпевают генетические, эпигенетические и фенотипические изменения, тем самым становясь гетерогенной клеточной популяцией, которую иммунные клетки почти не замечают или не могут атаковать из-за снижения секреции опухолевых антигенов и лигандов для рецепторов натуральной цитотоксичности (NCR, natural cytotoxicity receptors) [4]. Кроме того, злокачественные клетки подавляют натуральные киллеры, блокируя рецептор NKG2D [4] или активируя ингибирующие молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I, major histocompatibility complex class I) [5]. Поэтому *ex vivo* модуляция экспрессии рецепторов НК-клеток является важным инструментом для преодоления ингибирования иммунного ответа. При определённых условиях культивирования (использование активаторов, интерлейкинов и фидерных клеток) можно добиться повышения цитотоксичности НК-клеток [6].

Натуральные киллеры могут играть важную роль в клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний, и адаптивный перенос активированных НК-клеток

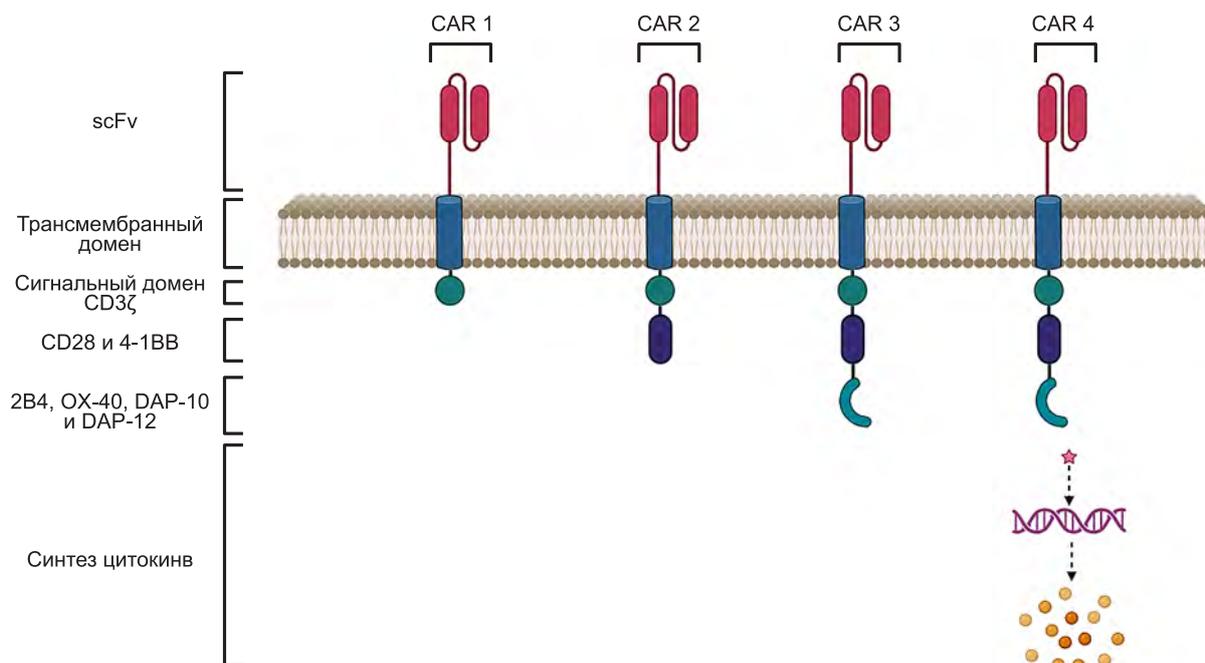
представляет собой перспективный подход для лечения онкологических больных [7]. Существует множество методик для размножения и активации НК-клеток *ex vivo*, которые включают использование различных активаторов размножения, комбинаций интерлейкинов для культивирования, а также стимуляцию фидерными клетками. Для повышения противоопухолевого потенциала НК-клеток также применяют генетическую модификацию этих клеток химерным рецептором антигена (CAR, chimeric antigen receptor), что лежит в основе CAR НК-терапии при онкологических заболеваниях [8].

## РАЗДЕЛ 2. ПРЕИМУЩЕСТВА ВЫБОРА НК-КЛЕТОК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ CAR-ТЕРАПИИ

CAR-терапия – это иммунотерапевтический подход для лечения онкологических заболеваний, основанный на экспрессии на поверхности иммунной клетки специфического генно-модифицированного рецептора к опухолевому антигену, что позволяет иммунной системе лучше распознавать и уничтожать опухолевые клетки [9]. Связывание антигена CAR-лимфоцитами или получение активационного сигнала от группы активирующих рецепторов приводит к передаче сигнала, который вызывает активацию клеток, высвобождение цитолитических ферментов, продукцию цитокинов, а также поддерживает выживаемость и пролиферацию этих лимфоцитов. CAR-терапия бывает двух видов: CAR T-терапия и CAR НК-терапия, для которых используются T-клетки или НК-клетки соответственно. На данный момент большее распространение и развитие получила CAR T-терапия, так как данные клетки проходят через стадию клональной экспансии, их можно получить от донора в большом количестве и они легче поддаются генетическим модификациям, чем натуральные киллеры.

В отличие от T-клеточной иммунотерапии, противоопухолевый ответ НК-клеток основан на антиген-независимом распознавании [10], а генетические манипуляции с НК-клетками улучшают их цитотоксичность, способность к распознаванию опухолевых клеток и жизнеспособность в опухолевом микроокружении [11]. CAR-рецептор имеет три части: внеклеточную область, состоящую из одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (scFv, single-chain variable fragment), который связывается с опухолеспецифическим антигеном, а также из трансмембранного и внутриклеточного доменов [8].

CAR-конструкции первого поколения состояли из scFv и в качестве сигнального домена имели цепь CD3 $\zeta$ . CAR-конструкции второго поколения дополнили CD28 или комбинация CD28 и сигнальной молекулы 4-1BB. Позже в третьем поколении T-лимфоциты были оснащены такими специфическими сигнальными эндодоменами, как 2B4, OX-40, DAP10 и DAP-12 [12]. CAR-клетки четвёртого поколения дополнительно экспрессируют различные интерлейкины и хемокины, которые способны повысить эффективность и безопасность проводимой терапии [13] (рис. 1).



**РИС. 1.**  
CAR-конструкции разных поколений

Разработка CAR T-технологии произвела революцию в области лечения рака. Однако созданный в настоящее время клеточный продукт имеет ряд недостатков для его широкого применения, включая высокую стоимость, ориентированное на отдельно взятого пациента производство, непредсказуемость в функционировании клеток *in vivo*, а также тяжёлые побочные эффекты. Использование НК-клеток для лечения опухолей имеет потенциал для решения некоторых из этих проблем.

CAR-трансдуцированные НК-клетки обладают преимуществами относительно CAR-T-клеток при таргетной иммунотерапии. Во-первых, при введении пациентам НК-клеток не требуется подбора донора и реципиента на совместимость по главному лейкоцитарному антигену человека (HLA, human leukocyte antigen). Кроме того, введение НК-клеток хорошо переносится пациентами, не провоцирует развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [14]. Следовательно, в отличие от CART-терапии, при которой используют главным образом аутологичные клетки, при CAR НК-терапии возможно использование аллогенных клеток, что крайне важно при лечении онкологических пациентов, у которых на фоне лучевой терапии и химиотерапии наблюдается снижение функций иммунной системы. Во-вторых, CAR НК-клетки не вызывают тяжёлых токсических реакций: активированные НК-клетки выделяют «безопасные» цитокины, такие как IFN- $\gamma$  и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, в то время как CAR T-клетки в основном секретируют провоспалительные цитокины (TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 и ИЛ-6), которые вызывают синдром высвобождения цитокинов (СВЦ) [15]. Кроме того, натуральные киллеры являются короткоживущей популяцией лимфоцитов, поэтому при их доставке непосредственно в область опухоли внеопухолевые побочные реакции возникают редко [16]. Од-

**FIG. 1.**  
Different generations of CAR constructions

нако при системном введении в ряде случаев пациенту может потребоваться многократное введение CAR НК-клеток, что способно усилить появление побочных реакций и отторжения [16]. Хотя на сегодняшний день CAR-терапия не имеет широкого клинического применения, первые клинические испытания подтверждают безопасность CAR НК-клеток: у испытуемых не наблюдается СВЦ, нейротоксичности и развития РТПХ [17, 18].

### РАЗДЕЛ 3. ТЕКУЩИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ CAR НК-ТЕХНОЛОГИИ

Одним из ключевых недостатков адоптивных НК-клеток является отсутствие выживаемости *in vivo* инфузионных клеток без дополнительного введения цитокинов. Несмотря на относительную безопасность цитокинов, они способны снизить эффективность иммунотерапии. Экзогенные цитокины увеличивают пролиферацию и сроки жизни введённых в организм НК-клеток, однако они также могут вызывать нежелательные побочные эффекты, в том числе рост ингибирующих иммунных субпопуляций, например Т-регуляторных клеток (Treg) [19]. Выходом из данной ситуации является генетическая модификация НК-клеток трансгенами, кодирующими цитокины, которые экспрессируются на мембранах или конститутивно секретируются. Такая модификация лежит в основе CAR-конструкций четвёртого поколения. В одном из исследований, проведённом на мышах с опухолями, НК-клетки трансдуцировали ретровирусными векторами, несущими гены ИЛ-2 и ИЛ-15; у данных клеток наблюдалось повышение пролиферации и выживаемости [20]. Было показано, что интеграция трансгена ИЛ-15

в CAR-конструкцию улучшала пролиферацию НК-клеток, персистенцию *in vivo* и противоопухолевую активность у пациентов с лимфоидными злокачественными образованиями высокого риска, при этом не наблюдалось повышения системной концентрации ИЛ-15 или токсичности [21]. Другим способом поддержания НК-клеток *in vivo* является создание фенотипа, похожего на НК-клетки памяти: под действием кратковременной активации ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18 НК-клетки способны дифференцироваться в цитокин-индуцированные натуральные киллеры, сходные с НК-клетками памяти [22]. Такие клетки после модификации анти-CD19 CAR-рецептором показывают высокую активность как *in vitro*, так и *in vivo* против резистентной к НК-клеткам В-клеточной лимфомы [23].

Миграция клеток к опухоли после адоптивного переноса имеет важное значение для проводимой терапии и зависит от сложных взаимодействий между хемокинами, выделяющимися НК-клетками и опухолевыми клетками [24]. Миграция инфузионных НК-клеток в область опухоли не всегда оказывается завершённой, поэтому возникает потребность в улучшении этого процесса. По данным литературы, миграцию НК-клеток усиливают хемокиновый рецептор CCR7, перенесенный посредством трофоцитоза, и гиперэкспрессия CXCR1, CXCR2, CXCR3 и CXCR4 [8].

Ещё одним препятствием для успешной CAR НК-клеточной терапии является опухолевое микроокружение, которое представляет собой гипоксическую среду с отсутствием питательных веществ и низким значением pH и характеризуется наличием иммуносупрессивных клеток и различных веществ [25]. Негативно влияют на функционирование НК-клеток такие вещества, как трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ), аденозин, индоламин 2,3-диоксигеназа, простагландин E2 (PGE2), противовоспалительные цитокины и метаболиты, а также Tregs, супрессорные клетки миелоидного происхождения, опухоль-ассоциированные макрофаги, тромбоциты, фибробласты [26]. В настоящее время разрабатываются подходы к созданию устойчивости НК-клеток к TGF- $\beta$  без потери у них литической функции и способности к пролиферации [26]. Блокировка высокоаффинного A2A-рецептора к аденозину, который является важным метаболитом в реакциях иммуносупрессии и выделяется из аденозинтрифосфата при гипоксии и клеточном стрессе, приводит к усилению противоопухолевой активности на мышиных моделях рака молочной железы, меланомы и фибросаркомы [27].

Другим важным иммуноингибирующим механизмом является опухолевая активация молекул иммунных контрольных точек [8]. Поэтому иным подходом к подавлению опухолевого микроокружения является дополнительное редактирование генома CAR НК-клеток с целью устранения таких контрольных точек, как, например, TIGIT, NKG2A, CIS, а также PD-1 и CTLA4 [8]. Описанные в литературе генно-инженерные подходы и технологии для редактирования генома, возможно, помогут преодолеть препятствия на пути CAR НК-иммунотерапии. Если разработанные подходы позволят улучшить персистенцию НК-клеток, их миграцию и эффекторную функцию, то адоптивная НК-клеточная терапия может преобразоваться из метода безопасного ле-

чения с умеренной или низкой эффективностью в главное оружие в борьбе с онкологическими заболеваниями.

Хотя в данном обзоре не рассматриваются генно-инженерные методы получения CAR НК-клеток, необходимо упомянуть ещё один недостаток CAR-терапии – низкую эффективность трансдукции натуральных киллеров. Для трансдукции как Т-лимфоцитов, так и НК-клеток применяются ретровирусные и лентивирусные векторы, а также методики спинокуляции и электропорации. Ретровирусная трансдукция оказывает цитотоксическое воздействие на первичную культуру лимфоцитов, а также способна вызывать инсерционный мутагенез, в то время как трансдукция на основе лентивирусов является более безопасной ввиду меньшего риска инсерционного мутагенеза [28]. Поэтому самым распространённым подходом к модификации и доставке генов в иммунные клетки является система трансдукции с использованием лентивирусов.

Ввиду большого количества рецепторов врождённого иммунитета лентивирусная трансдукция НК-клеток малоэффективна, поэтому для улучшения трансдукции используются различные химические вещества. Например, электрический заряд на клеточной мембране можно нейтрализовать с помощью протамин сульфата или полимеров, например декстрана или полибрена [29]. Циклоспорин А и рапамицин способны ингибировать лентивирусные рестрикционные барьеры в гематопоетических стволовых клетках и клетках-предшественниках, а вектофузин-1, PGE2, розувастатин и декстран повышают скорость трансдукции в НК-клетках [8]. Повышение эффективности трансдукции возможно также при использовании псевдотипированного лентивирусного вектора с гликопротеином бабуиновой оболочки (BaEV-LV, baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors), имеющего эффективность трансдукции в 20 раз большую, чем у G-белка вируса везикулярного стоматита (VSVG, vesicular stomatitis virus G) [28].

#### РАЗДЕЛ 4. АУТОЛОГИЧНЫЕ ИЛИ АЛЛОГЕННЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ НК-КЛЕТОК

При CAR Т-иммунотерапии применение аллогенных лимфоцитов затруднено, поэтому большинство биомедицинских клеточных продуктов на основе Т-клеток представляют собой аутологичный препарат или, в случае использования аллогенных источников, требуют дополнительных генетических модификаций [30]. Использование аутологичных лимфоцитов в качестве источника клеток для их активации и генетической модификации как при CART-терапии, так и при CAR НК-терапии имеет ряд ограничений: естественная анергия иммунной системы пациента в отношении опухоли; угнетение функций иммунной системы вследствие химиотерапии или лучевой терапии; длительное время, необходимое для создания препарата. Перечисленные препятствия существенно снижают эффективность получаемого препарата вне зависимости от способа культивирования и генетической модификации.

Альтернативным подходом является использование аллогенных популяций, причём для CAR НК-терапии не тре-

буется тщательного подбора донора, что позволяет проводить терапию с использованием лимфоцитов, полученных от неродственных здоровых доноров [30]. Применение аллогенных препаратов также включает конечный этап заморозки полученной популяции лимфоцитов, что позволяет начинать иммунотерапию как можно раньше [31].

Также необходимо учитывать источник, откуда была получена популяция натуральных киллеров. Источниками НК-клеток могут быть мононуклеарные клетки периферической крови (МНК), пуповинная кровь, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и линии НК-клеток [32].

В большинстве исследований источником для создания CAR НК-клеток является периферическая кровь [33]. МНК можно собрать в большом количестве с помощью афереза; в настоящее время это предпочтительный источник для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Аферез проводится после проведения определённых медицинских мероприятий, направленных на увеличение количества циркулирующих клеток-предшественников и стволовых клеток (оценку проводят по количеству CD34<sup>+</sup> циркулирующих клеток) [32]. CD34<sup>+</sup> в данном случае могут выступать в роли клеток-предшественников натуральных киллеров. При проведении афереза без предварительного обогащения количество НК-клеток варьирует от 5 до 15 %.

На сегодняшний день костный мозг используется в качестве источника стволовых клеток в редких случаях, отчасти из-за трудностей забора и транспортировки относительно процедуры афереза. Поэтому в литературе представлено недостаточно данных о получении НК-клеток из костного мозга [32].

Первые клинические испытания использования пуповинной крови в качестве источника стволовых клеток появились более 30 лет назад, что в то время вызвало большой интерес у исследователей [33]. Пуповинную кровь можно использовать при неполном соответствии донор-реципиент, подбирая таким образом донора даже для тех пациентов, у которых не было HLA-совместимых родственных или неродственных доноров. Использование пуповинной крови в настоящее время активно конкурирует с быстро развивающейся областью родственной гаплоидентичной трансплантации. По официальным данным, в государственных банках пуповинной крови по всему миру хранится более 600 000 единиц пуповинной крови, однако фактически эта цифра гораздо выше, если принимать во внимание количество частных банков. Данная совокупность представляет собой уникальный источник человеческого материала для начала производственного процесса препаратов для иммунотерапии. В ряде исследований сообщается о получении значительного количества функциональных НК-клеток как из полной единицы пуповинной крови, так и из небольшого образца [34], что может служить основой для производства аллогенных CAR НК-лимфоцитов.

Получение НК-клеток из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых (иПС) клеток в настоящее время является крайне затруднительным. На плюрипотентность и способность к дифференцировке

репрограммированных иПС клеток влияют такие факторы, как выбор типа донорских соматических клеток-мишеней, методика генетических модификаций, а также метод, используемый для доставки факторов транскрипции в соматические клетки [35]. Получение НК-клеток с характерным рецепторным профилем и способностью к лизису клеток-мишеней возможно из эмбриональных клеток при 30-дневном культивировании отсортированных CD34<sup>+</sup>-клеток в присутствии фидеров и различных цитокинов [35]. В литературе также описан и другой метод экспансии натуральных киллеров из эмбриональной крови или иПС клеток [35].

При размножении первичных культур НК-клеток *ex vivo* они сохраняют жизнеспособность после адоптивного переноса в течение короткого промежутка времени. Для того чтобы увеличить жизнеспособность клеток, можно использовать клеточные линии натуральных киллеров, которые, кроме того, представляют собой более гомогенную популяцию, чем НК-клетки периферической крови. Наиболее изученной и подходящей для данных целей является клеточная линия NK-92 (NantKWest Inc., Калвер-Сити, Калифорния, США). Она обладает высокой цитотоксичностью и способностью к экспансивному росту [36]. Данную клеточную культуру также оценивали в доклинических исследованиях и клинических испытаниях (NCT00900809 и NCT00990717), однако NK-92 не обладала высокой эффективностью при лечении пациентов [37]. Внедрение CAR-рецептора на поверхность клеток NK-92 может повысить противоопухолевый потенциал данных клеток [38]. Однако данным клеткам требуется дополнительная трансфекция CD16-рецептора для появления АЗКЦ, что усложняет работу с указанной клеточной линией. Необходимо помнить, что по соображениям безопасности клеточная линия перед инфузией пациенту обязательно должна проходить этап облучения. Бесконтрольное деление клеточной культуры в организме пациента при сопутствующем наличии у него онкологического заболевания может быть серьёзным осложнением проводимой терапии.

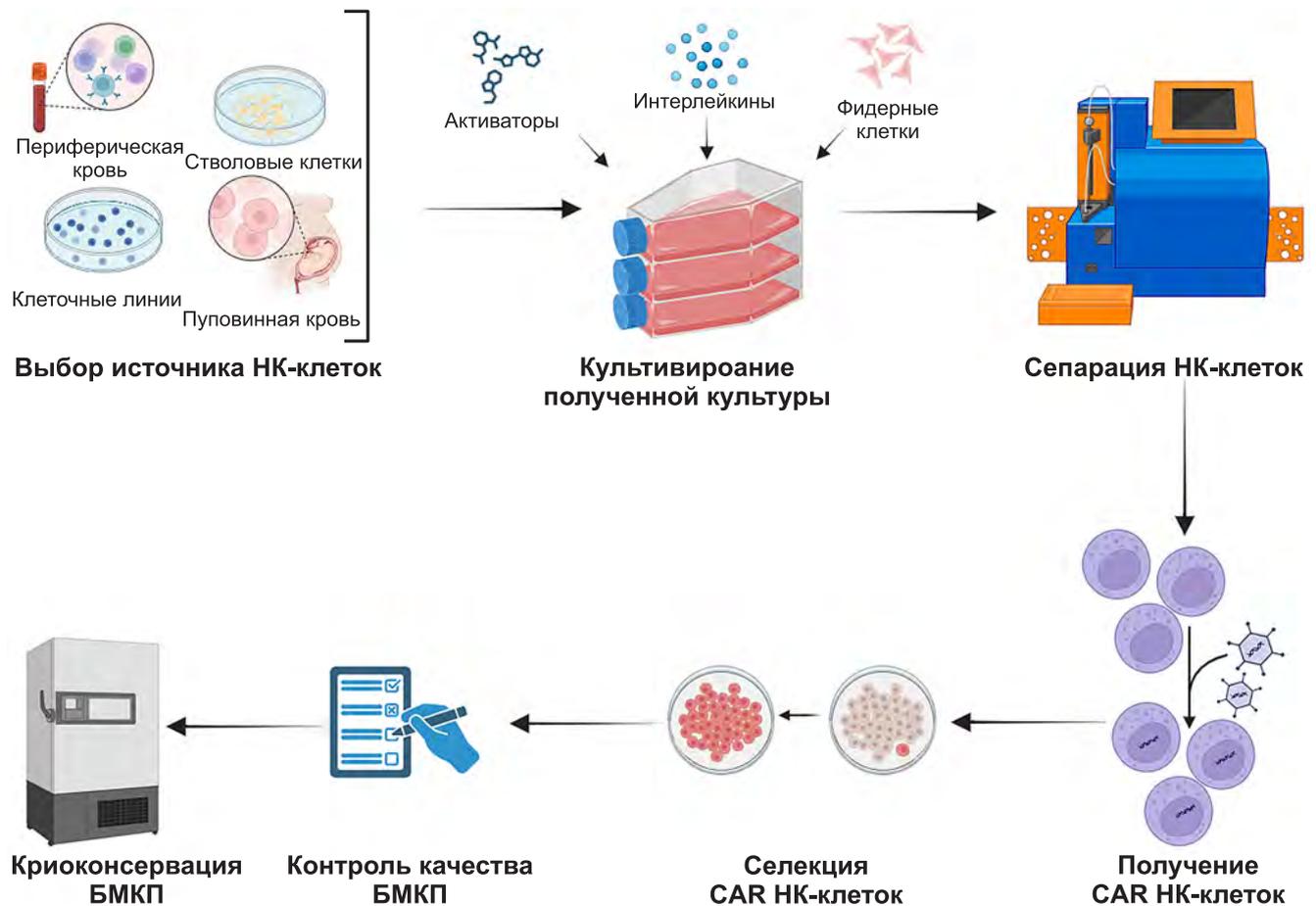
## РАЗДЕЛ 5. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК

Основная цель культивирования НК-клеток *ex vivo* – это получение обогащённой популяции с высокой экспрессией активационных маркеров, высокой цитотоксической активностью и способностью к экспансии. При взятии любым из вышеописанных способов натуральных киллеров от пациента невозможно сразу получить популяцию исключительно НК-клеток, так как в организме человека изолированно она не существует. Обогащение натуральных киллеров, то есть получение гомогенной культуры, состоящей преимущественно из НК-клеток, возможно либо с помощью разделения клеточных популяций на клеточном сортере или путём магнитной сепарации, либо при длительном культивировании под воздействием определённых условий. Как обогащение в культуре, так и разделение популяций требуют одних и тех же этапов культивирования с добавлением различных стимуляторов и интерлейкинов.

Сепарацию CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>-клеток можно проводить либо сразу после забора материала, либо на финальном этапе культивирования [33]. Отложенная сепарация представляется более предпочтительной, так как на выживаемость и пролиферацию популяции НК-клеток влияет их микроокружение: другие фракции клеток секретируют дополнительные пролиферативные факторы, однако нельзя исключить и взаимного ингибирования между популяциями. Например, CD14<sup>+</sup>-лимфоциты усиливают пролиферацию НК-клеток *ex vivo* за счёт прямого клеточного контакта и секреции растворимых факторов [39]. Однако данный вариант требует большего количества реагентов для культивирования, так как необходимо поддерживать все присутствующие популяции лимфоцитов. Кроме значительного преимущества по обогащению популяции натуральных киллеров метод магнитной сепарации имеет несколько важных недостатков: как правило, проведение магнитной сепарации существенно снижает жизнеспособность полученной клеточной популяции, а также требует использования дорогих реагентов. Тем не менее, при культивировании НК-клеток из МНК без сепарации отмечается экстенсивная совместная экспансия нежелательных CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup> Т-клеток и CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> НК-подобных Т-клеток (НКТ-клеток), составляющих большую часть клеток в конечном клеточном продукте.

В среднем для культивирования НК-клеток требуется от 7 до 21 дня. Помимо специфической ростовой среды, подбираемой исходя из источника НК-клеток, при культивировании также используются пулированная человеческая плазма, человеческая сыворотка или фетальная бычья сыворотка, хотя и существует тенденция к подбору бессывороточных сред. На конечном этапе культивирования НК-клеток предлагается проводить криоконсервацию с целью получения стабильного препарата для клеточной терапии с такими заданными характеристиками, как количество клеток в препарате, их цитолитическая активность, пролиферативный потенциал, отсутствие пирогенных и токсических веществ, солей тяжёлых металлов, а также микробной контаминации.

Кроме того, для культивирования и генетических манипуляций над НК-клетками необходимо присутствие активаторов, интерлейкинов и фидерных клеток. В литературе также описаны различные физические условия и длительность культивирования, однако не существует работы, объединяющей и сравнивающей между собой эффективность различных подходов к культивированию и обогащению НК-клеток. На рисунке 2 схематично представлена одна из методик получения CAR НК-клеток для лечения онкологических заболеваний.



**РИС. 2.**  
Основные этапы производства биомедицинского клеточного продукта на основе CAR НК-клеток

**FIG. 2.**  
Main stages of manufacturing biomedical cell product based on CAR NK cells

### Интерлейкины

Добавление в питательную среду интерлейкинов является наиболее простым в использовании методом активации и экспансии НК-клеток. ИЛ-2 играет важную роль в активации НК-клеток посредством связывания с рецептором ИЛ-2, который экспрессируется на НК-клетках. Поэтому ИЛ-2 с успехом используется для *ex vivo* размножения аллогенных донорских НК-клеток для адоптивной иммунотерапии [40]. Стимуляция НК-клеток *ex vivo* с помощью ИЛ-2 вызывает повышенную секрецию цитокинов, усиливает внутриклеточную передачу сигналов STAT3/АКТ и активирует различные NCR и NKG2D-рецептор [40]. ИЛ-2-активированные НК-клетки проявляют гораздо более высокую цитотоксическую активность в отношении культуры-мишени K562 по сравнению с нестимулированными НК-клетками [40]. Кроме того, после криоконсервации стимулированные ИЛ-2 НК-клетки имеют умеренную или высокую жизнеспособность при повторной активации данным цитокином, в то время как жизнеспособность нестимулированных ранее НК-клеток является низкой [41]. В различных клинических исследованиях были продемонстрированы безопасность и возможность использования ИЛ-2-активированных и размноженных НК-клеток для адоптивной иммунотерапии [42].

Для культивирования НК-клеток также важен ИЛ-15, который ингибирует индуцированную активацией гибель клеток и таким образом обеспечивает выживание натуральных киллеров [43]. Также ИЛ-15 повышает противоопухолевую активность НК-клеток посредством передачи сигналов через мишень рапамицина у млекопитающих (TOR, target of rapamycin) и посредством стресс-индуцированной экспрессии генов [44]. Однако при культивировании в присутствии ИЛ-15 необходимо подбирать оптимальную дозировку и кратность добавления данного цитокина, поскольку ИЛ-15-опосредованная передача сигналов может вызывать функциональное истощение НК-клеток за счёт снижения окисления жирных кислот, что приводит к снижению цитотоксичности как *in vitro*, так и *in vivo* [45].

В некоторых методиках экспансии НК-клеток в сочетании с ИЛ-2 или ИЛ-15 используется ИЛ-21 [46]. ИЛ-21 участвует в развитии НК-клеток из предшественников костного мозга и обеспечивает функциональное созревание данных клеток [46]. Было показано, что при туберкулёзе экспансия НК-клеток памяти зависит от ИЛ-21 [47]. При ВИЧ-инфекции были получены противоречивые данные: одна группа исследователей заявила о повышенной пролиферации CD56<sup>bright</sup>-популяции в присутствии ИЛ-21 [48], в то время как в других исследованиях влияние ИЛ-21 на пролиферацию НК-клеток не было установлено [49]. Также ИЛ-21 приводит к сокращению продолжительности жизни НК-клеток *in vitro* [50], поэтому, как и при использовании ИЛ-15, необходимо подбирать оптимальную дозировку ИЛ-21 при культивировании натуральных киллеров. Помимо воздействия на пролиферацию, ИЛ-21 усиливает эффекторные функции НК-клеток, включая секрецию цитокинов и прямую и непрямую цитотоксичность [51]. По результатам клинического исследования, НК-клетки, культивируемые с ИЛ-21 и ИЛ-15 без фидерных клеток, имели слабую пролиферативную активность, однако обладали высокой цито-

токсической активностью в отношении первичных лейкозов, их введение хорошо переносилось пациентами и коррелировало со снижением прогрессирования лейкемии по сравнению с историческим контролем [46].

ИЛ-12 является стимулятором НК-клеток, вызывая пролиферацию, повышенную цитотоксичность и секрецию IFN- $\gamma$  НК-клетками. ИЛ-12-опосредованная секреция НК-клетками IFN- $\gamma$  происходит при праймировании с ИЛ-18, который, как известно, усиливает ИЛ-15-индуцированную пролиферацию НК-клеток [52]. Так как интерлейкины обладают синергизмом, то кажется разумным комбинировать различные цитокины для *ex vivo* стимуляции НК-клеток. Поэтому комбинирование ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18 вызывает особый интерес, так как это приводит к появлению т. н. «цитокин-индуцированных НК-клеток памяти» (CIML, cytokine-induced memory-like NK cells), которые проявляют повышенную способность продуцировать IFN- $\gamma$  при повторной стимуляции [53]. Адоптивный перенос CIML обладает существенной противоопухолевой активностью *in vivo* против меланомы или лимфомы [54]. Комбинация ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18 также приводит к повышению чувствительности CIML к низкой концентрации ИЛ-2 *in vitro* и *in vivo* [55].

### Фидерные клетки

Большинство протоколов используют только стимуляцию цитокинами, однако это приводит к ограниченной экспансии НК-клеток. Использование фидерных клеток обеспечивает проведение дополнительных стимулирующих сигналов, так как они активируют межклеточное взаимодействие натуральных киллеров с моноцитами, в то время как цитокины представляют собой гуморальные факторы, воздействующие только на рецепторы к цитокинам. Следует отметить, что термин «фидерные клетки» применим для всех инактивированных клеток, которые добавляются к культуре, в то время как сокультивируемые не-НК-клетки, которые не подвергались инактивации, обозначаются как «вспомогательные клетки».

В качестве фидерных клеток используются или МНК (либо аутологичные, либо аллогенные) [56], или такие клеточные линии, как EBV-TM-LCL (В-клеточная лимфобластома, трансформированная вирусом Эпштейна – Барр), K562 (хроническая миелогенная лейкемия) с различными генетическими модификациями [57], U937 (промоноцитная лейкемия), СЕМ (Т-лимфобластная лейкемия), а также Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия) [58].

При использовании фидерных клеток из МНК необходимо их облучение, чтобы избежать их размножения и снижения процентного соотношения НК-клеток в полученном БМКП. Помимо инактивации роста, облучение может вызывать активацию на МНК стресс-регулируемых поверхностных молекул, например ULBP1-3, которые дополнительно активируют НК-клетки [59]. Причём большим потенциалом обладают аутологичные МНК, которые до облучения подвергались активации ИЛ-2, ОКТ3 и Ретронектином [60]. Как показывают исследования, количество отдельных KIR<sup>+</sup> НК-клеток может увеличиваться в 160–390 раз за 19 дней при культивировании с ИЛ-2, ИЛ-15, ОКТ3 и облучёнными аутологичными МНК [61].

Использование аллогенных МНК может оказаться эффективным методом стимуляции НК-клеток [62],

особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом или транзиторным иммунодефицитом. Использование аллогенных МНК также упрощает разработку CAR НК-продукта для масштабного клинического применения, поставленного «на поток», поскольку активацию и криоконсервацию аллогенных фидеров можно проводить задолго до начала культивирования НК-клеток.

К другим подходам к стимуляции НК-клеток относится использование клеточных линий, обладающих определёнными преимуществами относительно первичных культур МНК: неприхотливость в питательных средах, простота культивирования, способность к неограниченному делению. Ещё одним достоинством клеточных линий является то, что их относительно легко генетически модифицировать с целью интеграции дополнительных факторов для пролиферации НК-клеток. Среди модифицированных клеток для стимуляции натуральных киллеров используется, например, культура K562, экспрессирующая мембраносвязанный ИЛ-15 и 41BBL (K562-mb15-41BBL) [63]. Неизменная культура K562 вызывает слабую пролиферацию НК-клеток (2,5-кратное увеличение за одну неделю), а с K562-mb15-41BBL количество НК-клеток может значительно увеличиться в 20 раз за одну неделю (или в 1000 раз за три недели) [63]. Кроме того, при стимуляции НК-клеток при помощи K562-mb15-41BBL они обладают значительным пролиферативным потенциалом *ex vivo* [63]. НК-клетки, культивируемые в присутствии K562-mb15-41BBL, проявляют повышенную прямую и непрямую цитотоксичность против нескольких аллогенных и аутологичных опухолей *in vitro*, а также способны бороться с опухолью у мышей [64]. Встраивание в мембрану клеток K562 ИЛ-21 вместо ИЛ-15 является ещё более эффективным методом экспансии натуральных киллеров, а еженедельная рестимуляция клеточной линией K562, экспрессирующей мембраносвязанный ИЛ-21 и 41BBL, обеспечивает устойчивую пролиферацию НК-клеток в течение нескольких недель [65]. При подобном сокультивировании у натуральных киллеров наблюдается увеличение длины теломера и усиление активации сигнального пути STAT-3, что объясняет положительный эффект данной культуры на размножение НК-клеток в течение длительного времени [65].

Стимулирующий эффект культуры EBV-LCL на пролиферацию НК-клеток был обнаружен более 40 лет назад [66]; в настоящее время исследуется возможность их применения для активации аутологичных клеток с последующим адоптивным переносом [67]. Согласно данным литературы, самым эффективным протоколом по экспансии НК-клеток с использованием фидерных клеток является стимуляция культурой SMI-LCL, культивирование в присутствии ИЛ-2 и добавление ИЛ-21 только в начале культивирования. При соблюдении этих условий наблюдается 1011-кратное увеличение количества НК-клеток [68]. Полученные таким образом НК-клетки обладают высокой цитотоксичностью *in vitro* и повышенной секрецией IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и эффективно воздействуют на меланому на модели мышинного ксенотрансплантата [68].

Несмотря на эффективность применение фидерных клеток на доклиническом уровне, использование их при изготовлении БМКП вызывает некоторые затруднения, по-

скольку наличие остаточных фидерных клеток в конечном продукте представляет серьёзную проблему для клинического применения [69]. Также работа с фидерными клетками, особенно с аутологичными, обязательно должна включать регулярное тестирование на наличие вирусов, бактериальной и микоплазменной контаминации [70]. Поэтому в целях повышения безопасности и снижения трудоёмкости альтернативой фидерным клеткам могут служить клеточные лизаты, содержащие стимулирующие НК-клетки факторы. Было показано, что кратковременное культивирование НК-клеток с лизатом клеточной линии CTV-1 вызывает лизис клеток, устойчивых к неактивированным НК-клеткам [71]. Стимулирующий эффект CTV-1 на НК-клетки не зависит от KIR и не требует добавления ИЛ-2 или ИЛ-15, делая данный протокол по активации НК-клеток уникальным [72].

Вместо использования фидерных клеток или их лизатов также представляется возможным добавление в супернатант только определённых белков фидерных клеток, которые оказывают необходимое воздействие на натуральные киллеры. Например, НК-клетки можно размножить *ex vivo* с помощью добавления ИЛ-2 и частей плазматической мембраны, приготовленных из культуры K562-mb15-41BBL. При этом скорость размножения сравнима со скоростью деления НК-клеток, которые стимулировались интактными фидерными клетками, и намного превышает скорость размножения при использовании растворимых ИЛ-15, 41BBL и ИЛ-2 [73].

#### Активаторы

Кроме фидерных клеток, их лизатов и белков, а также различных цитокинов влиять на активацию и экспансию НК-клеток могут активаторы – растворимые вещества, способные связываться с определёнными рецепторами на поверхности натуральных киллеров и активировать их. ОКТЗ представляет собой моноклональное антитело к CD3-рецептору, которое используется для активации Т-клеток *in vitro* во многих методиках [74]. Стимуляция МНК ОКТЗ в присутствии ИЛ-2 приводит к секреции цитокинов, что влияет на экспансию НК-клеток [75]. Также Т-клетки способны влиять на пролиферацию НК-клеток после активации конканавалином А [76]. MICA, родственник МНС I белок, является лигандом для NKG2D-рецептора. Культивирование в присутствии MICA, ИЛ-15 и s4-1BBL приводит к экспансии НК-клеток и повышению у них противопухоловой активности в отношении клеток лейкемии [77]. Другие, более ранние, исследования показывают, что на активацию и пролиферацию натуральных киллеров положительно влияет липополисахарид [78], а фитогемагглютинин способен стимулировать НК-клетки даже сильнее, чем ОКТЗ [79].

## РАЗДЕЛ 6. ПОЛУЧЕНИЕ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ НК-КЛЕТОК

Поскольку CAR НК-клетки представляют собой БМКП, необходимо упомянуть о некоторых регуляторных аспектах. В клинических испытаниях доза НК-клеток при инфузии составляет в среднем от 5 до 50 × 10<sup>6</sup> клеток/кг [25]. Исхо-

дя из процентного содержания НК-клеток в исходных материалах, необходимо проводить массивную экспансию *in vitro* данных клеток, используя самые эффективные методики и реагенты. При проведении селекции и при культивировании без фидерных клеток прирост количества НК-клеток является небольшим [8]. Поэтому используемые методики по культивированию НК-клеток должны включать фидерные клетки, особенно аутологичные облученные МНК, так как это является самым безопасным вариантом.

Кроме того, необходимо создание критериев оценки эффективности различных протоколов по созданию CAR НК-продуктов. Такие критерии позволят сравнивать полученные по разным методикам CAR НК-клетки на предмет чистоты популяции НК-клеток, жизнеспособности клеток-мишеней, вирусной и бактериальной контаминации, стерильности и безопасности препарата [32]. Более сложное тестирование может включать дополнительную информацию, например, об уменьшении длины теломера, что указывает на старение клеток вследствие интенсивного клеточного деления в процессе культивирования [32]. Оценка фенотипического профиля и цитотоксической активности также помогла бы выявить наиболее эффективные БМКП, однако необходимо согласовать критерии оценки и определения панели фенотипических и функциональных биомаркеров.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, производство полноценного биомедицинского клеточного продукта на основе CAR НК-клеток представляет собой длительный и трудоёмкий процесс, включающий разработку как протокола для экспансии и активации натуральных киллеров, так и инструментов масштабирования и контроля качества полноценного производственного процесса. Создание БМКП начинается с выбора источника НК-клеток: это могут быть МНК периферической крови, стволовые клетки, пуповинная кровь или клеточные линии, причём каждый из названных источников обладает как достоинствами для использования, так и недостатками. При разработке CAR НК-клеток, в отличие от CAR T-клеток, требуется обязательный этап обогащения данной популяции, что затрудняет процесс производства БМКП. Обогащение популяции НК-клеток и получение чистого препарата без примесей клеток других популяций невозможно без использования методов сепарации или подбора оптимальных для пролиферации НК-клеток условий культивирования. К таким условиям относится использование активаторов, интерлейкинов или фидерных клеток. В качестве активаторов пролиферации НК-клеток можно использовать, например, антитела к CD3-рецептору, фитогемагглютинин или липополисахарид. Вероятно, экспансию НК-клеток способны усиливать и другие соединения, которые на данный момент изучены плохо или, в данном контексте, не изучены вовсе. Среди интерлейкинов, активирующих у НК-клеток эффекторные функции, а также процессы деления и созревания, наиболее предпочтительными являются ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21, а также комбинация из ИЛ-12, ИЛ-15

и ИЛ-18. При подборе концентрации и кратности использования цитокинов необходимо добиваться максимальной эффективности воздействия на НК-клетки без развития у них феномена истощённости. Альтернативным подходом для стимуляции НК-клеток является добавление облучённых аутологичных или аллогенных фидерных клеток, которые посредством межклеточного взаимодействия оказывают положительное влияние на натуральные киллеры. Многие подходы к культивированию НК-клеток включают использование интерлейкинов и фидерных клеток, в других протоколах дополнительно используют активаторы. Однако на данный момент не существует исследования, объединяющего и сравнивающего между собой эффективность различных подходов к культивированию НК-клеток. Для улучшения CAR НК-продукта этапы культивирования также должны быть направлены на повышение выживаемости натуральных киллеров их *in vivo* миграции в область опухоли, а также преодоление ингибирующего опухолевого микроокружения. Кроме того, непростой задачей представляется увеличение эффективности трансдукции, поскольку натуральные киллеры обладают мощным естественным противовирусным потенциалом. Тем не менее, ввиду важной клинической значимости использования в рамках CAR-терапии именно НК-клеток, а именно: отсутствия серьёзных побочных эффектов при введении CAR НК-клеток, их естественного противоопухолевого потенциала, а также возможности выбора аллогенных источников данной популяции иммунных клеток, автор данной статьи предполагает, что CAR НК-технология обладает существенными преимуществами относительно CAR T-иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний. Дальнейшие усилия исследователей в данной области должны быть направлены на усовершенствование технологии получения активированных CAR НК-клеток как в лабораторных условиях, так и при крупномасштабном производстве. Кроме того, необходимо проведение ряда клинических испытаний. Ввиду новизны и недостаточности клинических исследований CAR НК-терапии её конечная эффективность *in vivo* и преимущества относительно CAR T-терапии на сегодняшний день являются открытой темой для обсуждения.

### Конфликт интересов

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

### Выражение признательности

Автор выражает благодарность коллективу лаборатории клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за помощь в написании данной работы.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cianga VA, Campos Catafal L, Cianga P, Pavel Tanasa M, Cherry M, Collet P, et al. Natural killer cell subpopulations and inhib-

itory receptor dynamics in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Front Immunol.* 2021; 12: 665541. doi: 10.3389/fimmu.2021.665541

2. Грибкова И.В. CAR NK-клетки и возможность их использования для лечения гематологических новообразований. *Современная онкология.* 2022; 24(3): 331-335. [Gribkova IV. CAR NK-cells for the treatment of hematological malignancies: A review. *Journal of Modern Oncology.* 2022; 24(3): 331-335. (In Russ.)]. doi: 10.26442/18151434.2022.3.201699

3. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: A review. *Biomark Res.* 2020; 8: 49. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x

4. D'Silva SZ, Singh M, Pinto AS. NK cell defects: Implication in acute myeloid leukemia. *Front Immunol.* 2023; 14: 1112059. doi: 10.3389/fimmu.2023.1112059

5. Zhang L, Meng Y, Feng X, Han Z. CAR-NK cells for cancer immunotherapy: From bench to bedside. *Biomark Res.* 2022; 10(1): 12. doi: 10.1186/s40364-022-00364-6

6. Torelli GF, Rozera C, Santodonato L, Peragine N, D'Agostino G, Montefiore E, et al. A good manufacturing practice method to *ex vivo* expand natural killer cells for clinical use. *Blood Transfus.* 2015; 13: 464-471. doi: 10.2450/2015.0231-14

7. Yang YL, Yang F, Huang ZQ, Li YY, Shi HY, Sun Q, et al. T cells, NK cells, and tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy and the current state of the art of drug delivery systems. *Front Immunol.* 2023; 14: 1199173. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199173

8. Khawar MB, Sun H. CAR-NK cells: From natural basis to design for kill. *Front Immunol.* 2021; 12: 707542. doi: 10.3389/fimmu.2021.707542

9. Chohan KL, Siegler EL, Kenderian SS. CAR-T cell therapy: The efficacy and toxicity balance. *Curr Hematol Malig Rep.* 2023; 18(2): 9-18. doi: 10.1007/s11899-023-00687-7

10. Yu Y. The function of NK cells in tumor metastasis and NK cell-based immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2023; 15(8): 2323. doi: 10.3390/cancers15082323

11. Carlsten M, Childs RW. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: Techniques and clinical implications. *Front Immunol.* 2015; 6: 266. doi: 10.3389/fimmu.2015.00266

12. Киселевский М.В., Чикилева И.О., Ситдикова С.М., Власенко Р.Я., Караулов А.В. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным Т-клеточным рецептором (CAR-T-клеток) для терапии солидных опухолей. *Иммунология.* 2019; 40(4): 48-55. [Kiselevsky MV, Chikileva IO, Sitdikova SM, Vlasenko RYa, Karaulov AV. Prospectives of application of the genetically modified lymphocytes with chimeric T-cell receptor (CAR-T-cells) for the therapy of solid tumors. *Immunologiya.* 2019; 40(4): 48-55. (In Russ.)]. doi: 10.24411/0206-4952-2019-14006

13. Duan D, Wang K, Wei C, Feng D, Liu Y, He Q, et al. The BCMA-targeted fourth-generation CAR-T cells secreting IL-7 and CCL19 for therapy of refractory/recurrent multiple myeloma. *Front Immunol.* 2021; 12: 609421. doi: 10.3389/fimmu.2021.609421

14. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Горчаков А.А., Кулемзин С.В. Комбинированная терапия рака на основе онколитической виротерапии и таргетной CAR T/NK-клеточной иммунотерапии. *Молекулярная биология.* 2020; 54(1): 3-16. [Kochneva GV, Sivolobova GF, Tkacheva AV, Gorchakov AA, Kulemzin SV. Combined therapy of cancer on the basis of oncolytic virotherapy and targeted CAR T/NK-cell immunotherapy. *Molecular Biology.* 2020; 54(1): 3-16. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0026898420010103

15. Fitzgerald JC, Weiss SL, Maude SL, Barrett DM, Lacey SF, Melnhorst JJ, et al. Cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Crit Care Med.* 2017; 45(2): e124-e131. doi: 10.1097/CCM.0000000000002053

16. Nazimuddin F, Finklestein JM, Gupta M, Kulikovskaya I, Ambrose DE, Gill S, et al. Long-term functional persistence, B cell aplasia and anti-leukemia efficacy in refractory B cell malignancies following T cell immunotherapy using CAR-redirectioned T cells targeting CD19. *Blood.* 2013; 122 (21): 163. doi: 10.1182/blood.V122.21.163.163

17. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N Engl J Med.* 2020; 382(6): 545-553. doi: 10.1056/NEJMoa1910607

18. Marin D, Li Y, Basar R, Rafei H, Daher M, Dou J, et al. Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19<sup>+</sup> B cell tumors: A phase 1/2 trial. *Nat Med.* 2024; 30(3): 772-784. doi: 10.1038/s41591-023-02785-8

19. Pedroza-Pacheco I, Madrigal A, Saudemont A. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: Perspectives for immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2013; 10(3): 222-229. doi: 10.1038/cmi.2013.2

20. Matosevic S. Viral and nonviral engineering of natural killer cells as emerging adoptive cancer immunotherapies. *J Immunol Res.* 2018; 2018: 678-689. doi: 10.1155/2018/4054815

21. Liu E, Tong Y, Dotti G, Shaim H, Savoldo B, Mukherjee M, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia.* 2018; 32(2): 520-531. doi: 10.1038/leu.2017.226

22. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood.* 2012; 120(24): 4751-4760. doi: 10.1182/blood-2012-04-419283

23. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2016; 8(357): 357ra123-357ra123. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf2341

24. Castriconi R, Carrega P, Dondero A, Bellora F, Casu B, Regis S, et al. Molecular mechanisms directing migration and retention of natural killer cells in human tissues. *Front Immunol.* 2018; 9: 2324. doi: 10.3389/fimmu.2018.02324

25. Marofi F, Abdul-Rasheed OF, Rahman HS, Budi HS, Jalil AT, Yumashev AV, et al. CAR-NK cell in cancer immunotherapy: A promising frontier. *Cancer Sci.* 2021; 112(9): 3427-3436. doi: 10.1111/cas.14993

26. Daher M, Basar R, Shaim H, Gokdemir E, Uprety N, Kontoyianis A, et al. The TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway as a mediator of NK cell dysfunction and immune evasion in myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2017; 130(Suppl 1): 53. doi: 10.1182/blood.V130.Suppl\_1.53.53.

27. Young A, Ngiow SF, Gao Y, Patch A-M, Barkauskas DS, Messaoudene M, et al. A2AR adenosine signaling suppresses natural killer cell maturation in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2018; 78(4): 1003-1016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2826

28. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine.* 2020; 59: 102975. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102975

29. Nanbakhsh A, Best B, Riese M, Rao S, Wang L, Medin J, et al. Dextran enhances the lentiviral transduction efficiency of murine and human primary NK cells. *J Vis Exp.* 2018; (131): 55063. doi: 10.3791/55063

30. Laskowski TJ, Biederstädt A, Rezvani K. Natural killer cells in antitumor adoptive cell immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2022; 22(10): 557-575. doi: 10.1038/s41568-022-00491-0
31. Merino A, Maakaron J, Bachanova V. Advances in NK cell therapy for hematologic malignancies: NK source, persistence and tumor targeting. *Blood Rev*. 2023; 60: 101073. doi: 10.1016/j.blre.2023.101073
32. Chabannon C, Mfarrej B, Guia S, Ugolini S, Devillier R, Blaise D, et al. Manufacturing natural killer cells as medicinal products. *Front Immunol*. 2016; 7: 504. doi: 10.3389/fimmu.2016.00504
33. Berrien-Elliott MM, Jacobs MT, Fehniger TA. Allogeneic natural killer cell therapy. *Blood*. 2023; 141(8): 856-868. doi: 10.1182/blood.2022016200
34. Vasu S, Berg M, Davidson-Moncada J, Tian X, Cullis H, Childs RW. A novel method to expand large numbers of CD56(+) natural killer cells from a minute fraction of selectively accessed cryopreserved cord blood for immunotherapy after transplantation. *Cytotherapy*. 2015; 17(11): 1582-1593. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.07.020
35. Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Monge J, Santos S, Vesga MA, Maruri N, et al. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol*. 2014; 5: 439. doi: 10.3389/fimmu.2014.00439
36. Kotzur R, Duev-Cohen A, Kol I, Reches A, Mandelboim O, Stein N. NK-92 cells retain vitality and functionality when grown in standard cell culture conditions. *PLoS One*. 2022; 17(3): e0264897. doi: 10.1371/journal.pone.0264897
37. Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*. 2013; 15(12): 1563-1570. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.017
38. Zhang Y, Zhou W, Yang J, Yang J, Wang W. Chimeric antigen receptor engineered natural killer cells for cancer therapy. *Exp Hematol Oncol*. 2023; 12(1): 70. doi: 10.1186/s40164-023-00431-0
39. Rölle A, Pollmann J, Ewen E, Le VTK, Halenius A, Hengel H, et al. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest*. 2014; 124: 5305-5316. doi: 10.1172/JCI77440
40. Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Esser R, Brinkmann A, Tramsen L, et al. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> subpopulations and *in vivo* influence after haploidentical NK cell infusion. *J Immunother*. 2010; 33: 200-210. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181bb46f7
41. Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann S-Y, Kloess S, Bremm M, et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol*. 2013; 3: 118. doi: 10.3389/fonc.2013.00118
42. Koehl U, Kalberer C, Spanholtz J, Lee D, Miller J, Cooley S, et al. Advances in clinical NK cell studies: Donor selection, manufacturing and quality control. *Oncoimmunology*. 2015; 5(4): e1115178. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115178
43. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33(1): 74-82. doi: 10.1200/JCO.2014.57.3329
44. Mao Y, van Hoef V, Zhang X, Wennerberg E, Lorent J, Witt K, et al. IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood*. 2016; 128: 1475-89. doi: 10.1182/blood-2016-02-698027
45. Felices M, Lenvik A, Chu S, McElmurry R, Cooley S, Tolar J, et al. Continuous IL-15 signaling leads to functional exhaustion of human natural killer cells through metabolic changes that alters their *in vivo* anti-tumor activity. *Blood*. 2016; 128(22): 551. doi: 10.1182/blood.V128.22.551.551
46. Choi I, Yoon SR, Park S-Y, Kim H, Jung S-J, Jang YJ, et al. Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: A dose-escalation study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20: 696-704. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.031
47. Venkatasubramanian S, Cheekatla S, Paidipally P, Tripathi D, Welch E, Tvinnereim AR, et al. IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol*. 2016; 10(4): 1-12. doi: 10.1038/mi.2016.105
48. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology*. 2007; 122: 486-495. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02675.x
49. Strbo N, de Armas L, Liu H, Kolber MA, Lichtenheld M, Pahwa S. IL-21 augments natural killer effector functions in chronically HIV-infected individuals. *AIDS*. 2008; 22: 1551-1560. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283089367
50. Li Q, Ye L-J, Ren H-L, Huyen T, Li J, Shi J-L, et al. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in *ex vivo* expansion. *Immunobiology*. 2015; 220: 876-888. doi: 10.1016/j.imbio.2015.01.009
51. McMichael EL, Jaime-Ramirez AC, Guenterberg KD, Luedke E, Atwal LS, Campbell AR, et al. IL-21 enhances natural killer cell response to cetuximab-coated pancreatic tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2017; 23: 489-502. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0004
52. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuseri N, Ryffel B, Dalod M, et al. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol*. 2008; 181: 1627-1631. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1627
53. Terrén I, Orrantia A, Astarloa-Pando G, Amarilla-Irusta A, Zenarruzabeitia O, Borrego F. Cytokine-induced memory-like NK cells: From the basics to clinical applications. *Front Immunol*. 2022; 13: 884648. doi: 10.3389/fimmu.2022.884648
54. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18-primed NK cells against established tumors. *J Exp Med*. 2012; 209: 2351-2365. doi: 10.1084/jem.20120944
55. Leong JW, Chase JM, Romee R, Schneider SE, Sullivan RP, Cooper MA, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20: 463-473. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.006
56. Koh EK, Lee HR, Son WC, Park GY, Bae J, Park YS. Antitumor effects of NK cells expanded by activation preprocessing of autologous feeder cells before irradiation in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2023; 25(6): 232. doi: 10.3892/ol.2023.13818
57. Phan MT, Kim J, Koh SK, Lim Y, Yu H, Lee M et al. Selective expansion of NKG2C+ adaptive NK cells using K562 cells expressing HLA-E. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(16): 9426. doi: 10.3390/ijms23169426
58. Ojo EO, Sharma AA, Liu R, Moreton S, Checkley-Luttge MA, Gupta K, et al. Membrane bound IL-21 based NK cell feeder cells drive robust expansion and metabolic activation of NK cells. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 14916. doi: 10.1038/s41598-019-51287-6
59. Hosseinzadeh F, Ai J, Ebrahimi-Barough S, Seyhoun I, Hajifathali A, Muhammadnejad S, et al. Natural killer cell expansion with autologous feeder layer and anti-CD3 antibody for immune

cell therapy of hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019; 20(12): 3797-3803. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.12.3797

60. Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, et al. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med*. 2015; 13: 277. doi: 10.1186/s12967-015-0632-8

61. Siegler U, Meyer-Monard S, Jorger S, Stern M, Tichelli A, Gratwohl A, et al. Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients. *Cytotherapy*. 2010; 12: 750-763. doi: 10.3109/14653241003786155

62. Liu S, Galat V, Galat Y, Lee YKA, Wainwright D, Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: From basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*. 2021; 14(1): 7. doi: 10.1186/s13045-020-01014-w

63. Gómez García LM, Escudero A, Mestre C, Fuster Soler JL, Martínez AP, Vagace Valero JM, et al. Phase 2 clinical trial of infusing haploidentical K562-mb15-41BBL-activated and expanded natural killer cells as consolidation therapy for pediatric acute myeloblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2021; 21(5): 328-337.e1. doi: 10.1016/j.clml.2021.01.013

64. Muñoz Builes M, Vela Cuenca M, Fuster Soler JL, Astigaraga I, Pascual Martínez A, Vagace Valero JM, et al. Study protocol for a phase II, multicentre, prospective, non-randomised clinical trial to assess the safety and efficacy of infusing allogeneic activated and expanded natural killer cells as consolidation therapy for paediatric acute myeloblastic leukaemia. *BMJ Open*. 2020; 10(1): e029642. doi: 10.1136/bmjopen-2019-029642

65. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained *ex vivo* proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*. 2012; 7: e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264

66. Hercend T, Meuer S, Reinherz EL, Schlossman SF, Ritz J. Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell" fraction of human peripheral blood. *J Immunol*. 1982; 129: 1299-1305.

67. Allan DSJ, Wu C, Mortlock RD, Chakraborty M, Rezvani K, Davidson-Moncada JK, et al. Expanded NK cells used for adoptive cell therapy maintain diverse clonality and contain long-lived memory-like NK cell populations. *Mol Ther Oncolytics*. 2022; 28: 74-87. doi: 10.1016/j.omto.2022.12.006

68. Granzin M, Stojanovic A, Miller M, Childs R, Huppert V, Cerwenka A. Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven *ex vivo* expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncimmunology*. 2016; 5: e1219007. doi: 10.1080/2162402X.2016.1219007

69. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014; 111(6): 1021-1046. doi: 10.1038/bjc.2014.166

70. Lee DA. Regulatory considerations for NK cells used in human immuno-therapy applications. *Methods Mol Biol*. 2016; 1441: 347-361. doi: 10.1007/978-1-4939-3684-7\_29

71. North J, Bakhsh I, Marden C, Pittman H, Addison E, Navarrete C, et al. Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: Evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol*. 2007; 178: 85-94. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.85

72. Sabry M, Tsirogianni M, Bakhsh IA, North J, Sivakumaran J, Giannopoulos K, et al. Leukemic priming of resting NK cells is killer Ig-like receptors independent but requires CD15-mediated CD2 ligation and natural cytotoxicity receptors. *J Immunol*. 2011; 187: 6227-6234. doi: 10.4049/jimmunol.1101640

73. Oyer JL, Igarashi RY, Kulikowski AR, Colosimo DA, Solh MM, Zakari A, et al. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of AML using feeder-free, particle based approach. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21: 632-639. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.037

74. Ferry GM, Agbuduwe C, Forrester M, Dunlop S, Chester K, Fisher J, et al. A simple and robust single-step method for CAR-V $\delta$ 1  $\gamma$  $\delta$ T cell expansion and transduction for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2022; 13: 863155. doi: 10.3389/fimmu.2022.863155

75. Sutlu T, Stellan B, Gilljam M, Quezada HC, Nahi H, Gahrton G, et al. Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor. *Cytotherapy*. 2010; 12(8): 1044-1055. doi: 10.3109/14653249.2010.504770

76. Guan J, Wang G, Yang Q, Chen C, Deng J, Gu X, et al. Natural killer T cells in various mouse models of hepatitis. *Biomed Res Int*. 2021; 2021: 1782765. doi: 10.1155/2021/1782765

77. Jiang B, Wu X, Li XN, Yang X, Zhou Y, Yan H, et al. Expansion of NK cells by engineered K562 cells co-expressing 4-1BBL and mMICA, combined with soluble IL-21. *Cell Immunol*. 2014; 290(1): 10-20. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.04.011

78. Goodier MR, Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56+CD3- NK cells: A regulatory role of monocytes and IL-10. *J Immunol*. 2000; 165(1): 139-147. doi: 10.4049/jimmunol.165.1.139

79. Peighambarzadeh F, Najafalizadeh A, Esmaeil N, Rezaei A, Ashrafi F, Ganjalikhani Hakemi M. Optimization of *in vitro* expansion and activation of human natural killer cells against breast cancer cell line. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2020; 12(1): 17-23.

#### Сведения об авторе

**Фёдорова Полина Олеговна** – младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии, аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; лаборант-исследователь лаборатории клеточного иммунитета, Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей, ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: ppolite@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>

#### Information about the author

**Polina O. Fedorova** – Junior Research Officer at the Laboratory of Applied Virology, Postgraduate, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute; Clinical Research Assistant at the Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Therapy and Diagnostics of Tumor, N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology; Teaching Assistant at the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: ppolite@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>