

НК-КЛЕТКИ С КОЭКСПРЕССИЕЙ KIR И NKG2C КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ HER2-НАПРАВЛЕННЫХ CAR-NK-ЭФФЕКТОРОВ

**Алексеева Н.А.,
Стрельцова М.А.,
Коваленко Е.И.**

ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (117437, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Коньково, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Алексеева Надежда Алексеевна
e-mail: nadalex@inbox.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Для создания HER2-направленных CAR-NK-клеточных эффекторов важен выбор субпопуляции NK-клеток с высоким цитотоксическим потенциалом и чувствительностью к генетической модификации. Особый интерес в контексте терапии солидных опухолей представляют лицензированные KIR⁺ NK-клетки, экспрессирующие активирующий рецептор NKG2C.

Цель исследования. Получение HER2-CAR-NK-клеток на основе субпопуляций NK-клеток с различной экспрессией рецепторов KIR и NKG2C для элиминации HER2⁺ солидных опухолей.

Методы. NK-клетки HCMV-серопозитивного донора выделяли методом негативной магнитной сепарации из выделенных в градиенте плотности мононуклеаров периферической крови. Субпопуляции NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C получали методом клеточной сортировки и культивировали при стимуляции IL-2 и фидерными клетками. NK-клетки модифицировали геном, несущим конструкцию HER2-CAR, посредством ретровирусной трансдукции. Цитотоксическую активность полученных культур против сфероидов SKOV-3 детектировали по уровню дегранулирующих CD107a⁺ NK-клеток и по доле нежизнеспособных SytoxBlue⁺ опухолевых клеток в сфероиде.

Результаты. Получены HER2-CAR-NK-эффекторы на основе субпопуляций с различной экспрессией KIR и NKG2C. Показано, что NKG2C-экспрессирующие NK-клетки вне зависимости от экспрессии KIR обладают большей чувствительностью к ретровирусной трансдукции. При коинкубации полученных культур субпопуляций NK-клеток с HER2⁺ сфероидами опухолевых клеток SKOV-3 во фракции трансдуцированных клеток, несущих рецептор HER2-CAR, наблюдалась доля дегранулировавших клеток CD107a⁺, более чем в 4 раза превышающая уровень дегрануляции во фракции немодифицированных NK-клеток. Также в сфероиде SKOV-3 после коинкубации с KIR⁺NKG2C⁺ трансдуцированными NK-эффекторами наблюдалась меньшая доля жизнеспособных клеток по сравнению со сфероидом, который инкубировался с культурами KIR⁺NKG2C⁻.

Заключение. NKG2C⁺ NK-клетки обладали большей чувствительностью к трансдукции. Культуры KIR⁺NKG2C⁺ HER2-CAR-NK-клеток с большей эффективностью элиминировали HER2⁺ клетки-мишени в 3D-модели. Эти свойства делают NK-клетки, коэкспрессирующие KIR и NKG2C, перспективной основой для создания CAR-NK-эффекторов.

Ключевые слова: NK-клетки, NKG2C, HER2, ингибирующий рецептор KIR, химерный антигенный рецептор, адаптивная иммунотерапия

Статья поступила: 01.04.2026
Статья принята: 07.09.2026
Статья опубликована: 09.10.2026

Для цитирования: Алексеева Н.А., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И. NK-клетки с коэкспрессией KIR и NKG2C как основа для создания HER2-направленных CAR-NK-эффекторов. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 21-28. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.3

NK CELLS COEXPRESSING KIR AND NKG2C AS A BASIS FOR HER2-TARGETED CAR-NK EFFECTORS

**Alekseeva N.A.,
Streltsova M.A.,
Kovalenko E.I.**

Shemyakin-Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian
Academy of Science (Inner-city municipal
district of Konkovo, Miklukho-Maklay st.,
16/10, bldg. 1, Moscow 117437, Russian
Federation)

Corresponding author:
Nadezhda A. Alekseeva
e-mail: nadalex@inbox.ru

ABSTRACT

Background. For the development of HER2-targeted CAR NK cell effectors, it is important to select an NK cells subset with high cytotoxic potential and sensitivity to genetic modification. In the context of solid tumor therapy, licensed KIR⁺ NK cells expressing the activating receptor NKG2C are of particular interest.

Aim. To obtain HER2-CAR-NK cells based on NK cell subsets with different expression of KIR and NKG2C receptors for the elimination of HER2⁺ solid tumors.

Materials and methods. NK cells from an HCMV-seropositive donor were isolated by negative magnetic separation from peripheral blood mononuclear cells isolated by density gradient centrifugation. NK cell subsets with different expression of KIR and NKG2C were obtained by cell sorting and cultured with stimulation by IL-2 and feeder cells. NK cells were modified with a gene carrying the HER2-CAR construct via retroviral transduction. The cytotoxic activity of the cultures against SKOV-3 spheroids was detected by the level of degranulating CD107a⁺ NK cells and the proportion of nonviable SytoxBlue⁺ tumor cells in the spheroid.

Results. HER2-CAR-NK effectors were obtained based on subsets with different KIR and NKG2C expression. It was shown that NKG2C-expressing NK cells, regardless of KIR expression, have greater sensitivity to retroviral transduction. Upon co-incubation of the obtained cultures of NK cell subsets with HER2⁺ SKOV-3 tumor cell spheroids, in the fraction of transduced cells bearing the HER2-CAR receptor, the proportion of degranulated CD107a⁺ cells was more than 4-fold higher than the level of degranulation in the fraction of unmodified NK cells. Also, in SKOV-3 spheroids after co-incubation with KIR⁺ NKG2C⁺ transduced NK effectors, a lower proportion of viable cells was observed compared to spheroids that were incubated with KIR⁺ NKG2C⁻ cultures.

Conclusion. NKG2C⁺ NK cells exhibited greater sensitivity to transduction. Cultures of KIR⁺NKG2C⁺ HER2-CAR-NK cells eliminated HER2⁺ target cells more efficiently in a 3D model. These properties make NK cells coexpressing KIR and NKG2C a promising basis for the CAR-NK effectors development.

Key words: NK cells, NKG2C Receptor, HER2, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor, Chimeric Antigen Receptors, adoptive immunotherapy

Received: 01.04.2026
Accepted: 07.09.2026
Published: 09.10.2026

For citation: Alekseeva N.A., Streltsova M.A., Kovalenko E.I. NK cells coexpressing KIR and NKG2C as a basis for HER2-targeted CAR-NK effectors. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 21-28. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.3

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные солидные опухоли по сей день являются одной из основных причин смертности в человеческой популяции. Экспрессия некоторых маркеров в опухоли может способствовать избеганию иммунного надзора, а также стимуляции роста раковых клеток, что зачастую приводит к экспансии опухоли, метастазированию и неблагоприятному исходу заболевания. В частности, высокий риск рецидива ассоциирован с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/ErbB-2) [1]. Оверэкспрессия HER2 встречается в тканях опухоли молочной железы, яичника, кишечника. Таргетная терапия HER2⁺ опухолей может значительно повысить выживаемость пациентов, а также снизить неизбежное поражение здоровых тканей, которое наблюдается при более консервативных методах лечения, таких как химио- и радиотерапия. В настоящее время активно применяется и совершенствуется адаптивная терапия иммунными клетками, несущими на своей поверхности антиген-направленные рецепторы CAR (chimeric antigen receptor) [2]. Широко применяются CAR-T-лимфоциты, однако создание противораковых агентов на основе NK-клеток представляет особый интерес, поскольку NK-клетки, в отличие от Т-клеток, не провоцируют развития реакции трансплантат против хозяина [3]. CAR-NK-клетки уже эффективно применяются в терапии гематологических опухолей, в частности, CD19-CAR-NK-клетки зарекомендовали себя как высокоэффективные агенты против CD19-экспрессирующих опухолей [4]. Однако солидные опухоли, в отличие от гематологических патологий, представляют собой трехмерные структуры с плотными межклеточными контактами и особым микроокружением, включающим ряд растворимых и мембран-связанных супрессирующих факторов. В связи с этим требуется разработка новых подходов к повышению эффективности NK-клеточной терапии. Одним из таких подходов является выбор субпопуляции NK-клеток для введения CAR-конструкта. Эти клетки должны сочетать в себе высокое содержание цитотоксических гранул, выраженный пролиферативный потенциал для эффективного накопления *in vitro*, а также высокую чувствительность к генетической модификации.

Популяция NK-клеток отличается широким фенотипическим и функциональным разнообразием. По новейшей классификации, основанной на транскриптомном анализе, выделяют три основные когорты NK-клеток: цитотоксические клетки NK1, регуляторные NK2 и адаптивные клетки со свойствами памяти NK3 [5]. Известно, что накопление слабодифференцированных и чувствительных к растворимым факторам клеток NK2 в тканях солидных опухолей ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [6]. NK2 не только отличаются низким цитотоксическим потенциалом, но также экспрессируют на высоком уровне ингибирующий рецептор NKG2A [5]. Многие измененные ткани как зараженные вирусом, так и подвергшиеся

злокачественной трансформации экспрессируют лиганд NKG2A – молекулу HLA-E, благодаря чему успешно избегают иммунного надзора. Ось NKG2A-HLA-E является известным чекпойнтом, существует множество подходов к блокированию взаимодействия иммунных клеток по этой оси, включая блокирующие антитела к NKG2A и генную модификацию эффекторных клеток [7]. Однако HLA-E способен распознавать не только ингибирующий рецептор NKG2A, но также активирующий рецептор NKG2C [8]. Высокий уровень экспрессии NKG2C свойственен адаптивным клеткам когорты NK3 [5]. Наиболее хорошо изучены адаптивные клетки, пул которых формируется в ходе цитомегаловирусной инфекции (HCMV). Накопление NKG2C-позитивных клеток обусловлено тем, что один из белков HCMV кодирует пептид, гомологичный лидерной последовательности HLA класса I (HLA-I), который образует комплекс с HLA-E и представляется на поверхности зараженной клетки [9]. HCMV-специфические адаптивные клетки несут фенотип CD57⁺NKG2C⁺ и отличаются высокой продолжительностью жизни, а также выраженным уровнем антителозависимой цитотоксичности, что потенциально позволяет использовать их в сочетанной терапии с моноклональными антителами.

Помимо этого, адаптивным NK-клеткам когорты NK3, как высокодифференцированным функционально зрелым эффекторам, свойственна экспрессия ингибирующих рецепторов KIR к собственным HLA-I. Экспрессирующие KIR NK-клетки проходят лицензирование в окружении здоровых тканей организма. Лицензированные NK-клетки отличаются высоким содержанием литических гранул с гранзимом В и перфорином [10]. KIR-позитивные клетки проявляют высокую цитотоксичность против мишеней, не экспрессирующих их лиганды. Многие измененные клетки отличаются сниженной экспрессией HLA-I, что мешает Т-клеткам их узнавать и элиминировать. Известно, что адаптивные NK-клетки с фенотипом KIR⁺NKG2C⁺ обладают повышенной цитотоксичностью в отношении клеток острой миелоидной лейкемии [11]. Таким образом, NK-клетки, коэкспрессирующие ингибирующие рецепторы KIR и активирующий рецептор NKG2C, могут являться перспективной основой для создания высокотоксичных генномодифицированных противораковых CAR-эффекторов.

Целью настоящего исследования стало получение HER2-направленных эффекторов на основе NK-клеток с различной экспрессией маркеров KIR2DL2/3 и NKG2C и проверка их противоопухолевой активности в отношении сфероидов HER2-экспрессирующей линии рака яичников SKOV-3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

NK-клетки получены методом негативной магнитной сепарации из выделенных в градиенте плотности мононуклеаров периферической крови здорового HCMV-серопозитивного индивида, давшего

информированное согласие на участие в эксперименте. Этические нормы в ходе экспериментальных работ соответствовали принципам Хельсинкской декларации, исследование было одобрено Комитетом по этике Российского национального исследовательского медицинского университета им. Пирогова (протокол № 169 от 20 ноября 2017 г.). Титр антител к HCMV был определен методом иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Россия). Далее NK-клетки были помечены моноклональными антителами KIR2DL2/3-FITC, NKG2C-PE, CD56-PE-Vio615 (MiltenyiBiotec, Германия) и посредством клеточного сортировщика FACSVantageDiVa (BectonDickinson, США), оснащенного лазерами 405, 488 и 638 нм, отсортированы на субпопуляции KIR2DL2/3⁻NKG2C⁻, KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺, KIR2DL2/3⁺NKG2C⁻ и KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺. Полученные клетки культивировали в среде, содержащей 45 % среды NK MACS (MiltenyiBiotec, Германия) и 45 % DMEM (Панэко, Россия) при добавлении 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 2 мМ л-глутамина (Панэко), 1 % пирувата натрия (Панэко) и 1 % антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich, США), при 5 % CO₂, 37 °C. В качестве активирующих стимулов были использованы IL-2 в концентрации 100 ед./мл (Hoffmann-La-Roche, Швейцария) и облученные фидерные клетки K562-mbIL21 с мембраносвязанным IL-21. Вектор, несущий ген *HER2-CAR*, состоял из последовательностей, кодирующих антителоподобную молекулу DARPIn G3 – модуль распознавания антигена, аффинный к IV домену HER2; EF1a – конститутивный человеческий промотор hEF1a; c-мус – внеклеточный фрагмент для детекции CAR на поверхности; IgG1 – шарнирную область из человеческого IgG1; CD28-CD3 cyto – сигнальный регион; GFP – репортерный белок. Для накопления вирусных частиц, несущих вектор *HER2-CAR*, клетки линии PhoenixAmpho (любезно предоставленные д.б.н, проф. А.В. Филатовым (Институт Иммунологии, Россия)) подвергли трансфекции плазмидой, несущей конструкцию *HER2-CAR*. Трансфекция проводилась в обработанных полилизином чашках Петри в среде DMEM, содержащей 3 % FBS. Через 48 ч среду, содержащую накопленные вирусные частицы, собирали и концентрировали ультрацентрифугированием при 21 000 g в течение 2,5 часов при 4°C. Через 7 дней активации выделенные субпопуляции NK-клеток были подвергнуты ретровирусной трансдукции вирусными частицами, несущими конструкцию *HER2-CAR*. Трансдукция проводилась в 96-луночных планшетах, предварительно обработанных раствором ретронектина (20 µg/mL, Clontech/Takara, USA). Эффективность трансдукции определяли по экспрессии c-Мус, фрагмента внеклеточного домена CAR. Для оценки цитотоксической активности полученных CAR-NK-эффекторов получали 3D-культуры (сфероиды) SKOV-3. По 20 000 клеток SKOV-3 сажали в лунки агарозных форм и культивировали в полной среде DMEM в течение 3 дней, как было описано ранее [12]. Цитотоксичность NK-клеток определяли методом проточной цитометрии по уровню дегрануляции (CD107a⁺) и доле SytoxBlue⁺ нежизнеспособных опухолевых

клеток после коинкубации *HER2-CAR*-эффекторов и *HER2*⁺ мишеней в соотношении Е:Т = 1:1 в течение 4 ч. Коинкубацию проводили при добавлении монензина и моноклональных антител CD107a-PerCP (BioLegend, США). Краситель SytoxBlue (Invitrogen, США) добавляли непосредственно перед измерением, которое проводили на цитометре LongCyte (Challenbio, Китай), оснащенном тремя лазерами, 405, 488 и 638 нм. Обработка данных проводилась в программах FlowJo (FlowJo LLC, США) и GraphPadPrism 8.0 (StatsoftInc., США). Измерения проводились в 3–5 технических повторностях, число повторностей определялось количеством выделенных из крови NK-клеток каждой из субпопуляций. Для анализа нормально распределенных данных применялся *t*-тест Стьюдента, для множественного сравнения данных с ненормальным распределением применялся тест Краскела – Уоллиса либо парный непараметрический тест Вилкоксона. При *p* < 0.05 выборки считались достоверно различными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве мишеней в нашем исследовании были использованы 3D-культуры (сфероиды) линии опухоли яичника SKOV-3. Формирование трехмерной структуры может быть сопряжено с изменением экспрессии поверхностных маркеров, в том числе тех, на которые направлена таргетная терапия. Поэтому перед сокультивированием с NK-клеточными эффекторами мы оценили поверхностную экспрессию молекул *HER2*, *HLA-E* и *HLA-A,B,C* клетками SKOV-3 в 2D- и 3D-культурах. При формировании сфероидов наблюдалось повышение уровня экспрессии *HER2* (MFI (2D) = 115, MFI (3D) = 255), а также увеличение процентного содержания *HLA-E*-экспрессирующих клеток. Уровень экспрессии *HLA* класса I оставался неизменным (рис. 1А). Для последующих экспериментов мы выбрали HCMV-серопозитивного индивида с высокой долей NKG2C⁺ клеток (14 %) и оценили процентное содержание субпопуляций с различной экспрессией KIR и NKG2C (рис. 1Б). Поскольку индивид обладал генотипом *HLA-C1/C2*, среди ингибирующих рецепторов KIR для анализа популяционного состава и последующей сортировки был выбран рецептор KIR2DL2/3, лигандом которого является молекула *HLA-C1*. Таким образом, NK-клетки, экспрессирующие KIR2DL2/3 (далее KIR), с высокой вероятностью обладали характеристиками лицензированных клеток с высоким цитотоксическим потенциалом против клеток SKOV-3, обладающих генотипом *HLA-C2/C2*. Субпопуляция наименее дифференцированных клеток KIR⁻NKG2C⁻ составила 66,7 %, KIR⁻NKG2C⁺ – 9,12 %, KIR⁺NKG2C⁻ – 20,4 %, наиболее малочисленная субпопуляция клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C, – 3,75 %. Далее, посредством клеточной сортировки, пул NK-клеток был разделен на 4 субпопуляции с различной экспрессией KIR и NKG2C. Через 10 дней активации *in vitro* по уровню дегранулирующих клеток CD107a⁺ была оценена их цитотоксическая активность в отношении

сфероидов SKOV-3. Наблюдалась тенденция к более активной дегрануляции в культурах более дифференцированных клеток KIR⁺, наименьшая доля клеток CD107a⁺ детектировалась в клетках, не экспрессирующих ни KIR, ни NKG2C (рис. 1B). На седьмой день культуры NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C посредством ретровирусной трансдукции были модифицированы геном, несущим конструкцию химерного рецептора HER2-CAR. Эффективность трансдукции определяли по уровню экспрессии молекулы с-Мус, входящей в состав внеклеточного домена HER2-CAR. Наибольшие доли клеток с-Мус⁺ были выявлены в популяциях NKG2C-позитивных NK-клеток (рис. 1Г).

Чтобы оценить цитотоксическую активность культур NK-клеток после трансдукции гена HER2-CAR, их коинкубировали со сфероидом HER2-экспрессирующей клетки SKOV-3. Во всех популяциях наблюдалось увеличение доли дегранулирующих клеток CD107a⁺ более чем в 4 раза (рис. 2А). При этом доля дегранулирующих с-Мус⁺ клеток, несущих HER2-CAR на поверхности, не зависела от экспрессии KIR и NKG2C (рис. 2Б). Также была оценена жизнеспособность опухолевых клеток в сфероиде после коинкубации с трансдуцированными

KIR⁺ NK-клетками. Сфероиды SKOV-3 после коинкубации с NKG2C-позитивными NK-эффекторами содержали больше нежизнеспособных клеток по сравнению со сфероидом, который инкубировался с NKG2C-негативными культурами (рис. 2Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В своем исследовании мы показали, что субпопуляции с различной экспрессией KIR2DL2/3 и NKG2C обладают различной цитотоксической активностью в отношении сфероидов SKOV-3. Наименьшим уровнем дегрануляции отличались клетки субпопуляции KIR⁺ NKG2C⁻, представляющие собой слабодифференцированные клетки, содержащие также клетки когорты NK2, для которых свойственна высокая экспрессия NKG2A, молекулы-чекпойнта [5]. Мы показали, что клетки SKOV-3 экспрессируют HLA-E и способны через ось NKG2A-HLA-E подавлять цитотоксическую реакцию иммунных клеток. Помимо этого, известно, что некоторые опухоли, в том числе и клетки SKOV-3, способны продуцировать хемокины-аттрактанты CXCL9/10

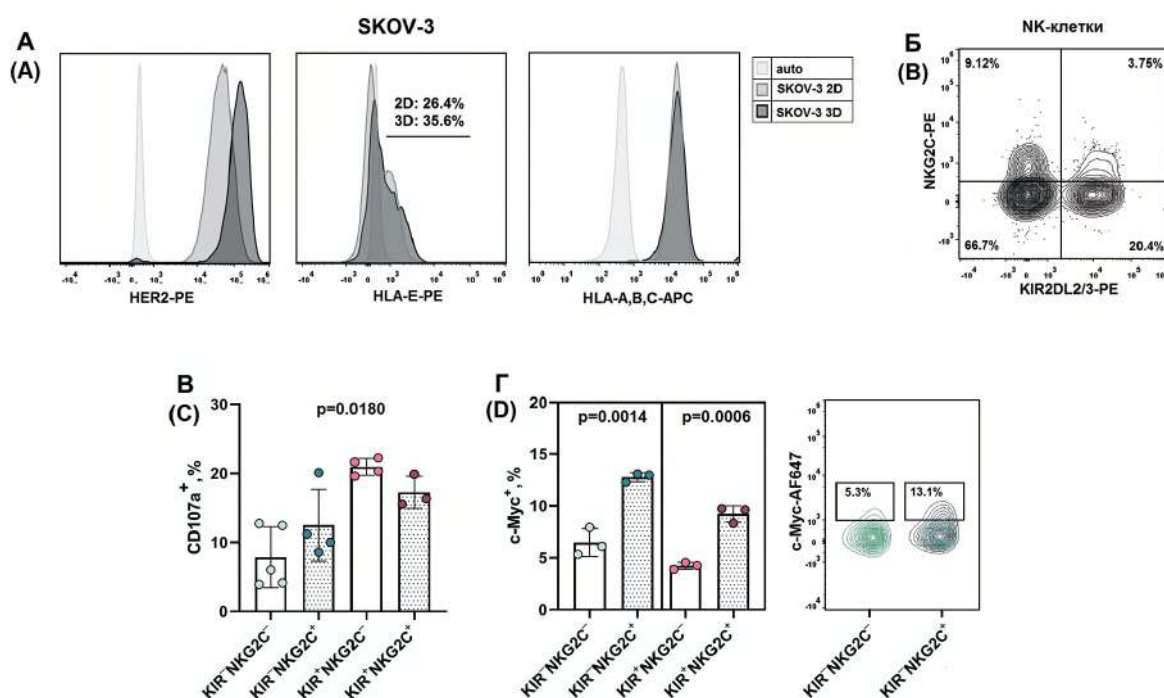


РИС. 1.

Цитотоксическая активность и эффективность трансдукции NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C. **А**—уровень экспрессии молекул HER2, HLA-E и HLA-A,B,C в 2D- и 3D-культурах опухолевой линии SKOV-3; **Б**—распределение субпопуляций по уровню экспрессии маркеров KIR и NKG2C в пуле NK-клеток индивида перед сортировкой на субпопуляции; **В**—доля дегранулировавших немодифицированных NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C при коинкубации со сфероидом SKOV-3; **Г**—эффективность трансдукции NK-клеток с различной экспрессией маркеров KIR и NKG2C (слева), репрезентативные цитометрические данные (справа).

FIG. 1.

Cytotoxic activity and transduction efficiency of NK cells with different expression of KIR and NKG2C. **A**—expression level of HER2, HLA-E and HLA-A,B,C molecules in 2D and 3D cultures of the SKOV-3 tumor line; **B**—distribution of subpopulations by expression level of KIR and NKG2C markers in the NK cell pool of an individual before sorting into subpopulations; **C**—the proportion of degranulated unmodified NK cells with different expression of KIR and NKG2C upon coincubation with SKOV-3 spheroids; **D**—transduction efficiency of NK cells with different expression of KIR and NKG2C markers (left), representative cytometric data (right).

и -11, которые способствуют привлечению в область опухоли CXCR3-позитивных NK-клеток [13, 14]. Такие клетки склонны к тканерезидентности за счет высокой экспрессии ряда молекул межклеточной адгезии, таких как CD44 и CD62L. Зачастую накопление низкодифференцированных NK-клеток в опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [6, 15]. Цитотоксическую активность клеток KIR⁺NKG2C⁻ можно повысить с помощью генетической модификации, внедрив в них рецептор HER2-CAR. Мы показали, что трансдуцированные клетки KIR⁺NKG2C⁻ не отличаются от остальных субпопуляций по уровню дегрануляции в ответ на инкубацию со сфероидом SKOV-3 и содержат высокие доли клеток CD107a⁺. Тем не менее, низкодифференцированным NK-клеткам свойственна низкая экспрессия перфорина и гранзимов А и В, что свидетельствует об их слабом цитотоксическом потенциале даже при высоких уровнях дегрануляции [5]. Кроме того, в культурах KIR⁺NKG2C⁻ наблюдалась меньшая эффективность трансдукции по сравнению с NKG2C-экспрессирующими

культурами. С учетом низкой цитотоксичности, высокого уровня экспрессии чекпойнта NKG2A, а также низкой чувствительности к трансдукции можно заключить, что NK-клетки субпопуляции KIR⁺NKG2C⁻ могут обладать ограниченным противоопухолевым потенциалом.

NK-клетки, экспрессирующие рецептор KIR2DL2/3, обладали повышенным уровнем дегрануляции в ответ на SKOV-3 по сравнению с KIR2DL2/3-негативными. Лигандами KIR2DL2/3, распознавание которых приводит к ингибированию цитотоксической реакции, являются молекулы HLA-C1 [16]. Линия рака яичников SKOV-3 несет генотип HLA-C2/C2, таким образом, не способна ингибировать цитотоксичность NK-клеток по оси KIR2DL2/3-HLA-C1, что могло приводить к более интенсивной дегрануляции. Известно, что при аллогенной трансплантации костного мозга (ККМ) особенно важен подбор донора с рецепторами KIR, распознающими HLA-I реципиента. Однако в случае миелоидной лейкемии возможна трансплантация донорских тканей, содержащих KIR⁺ NK-клетки, проявляющие

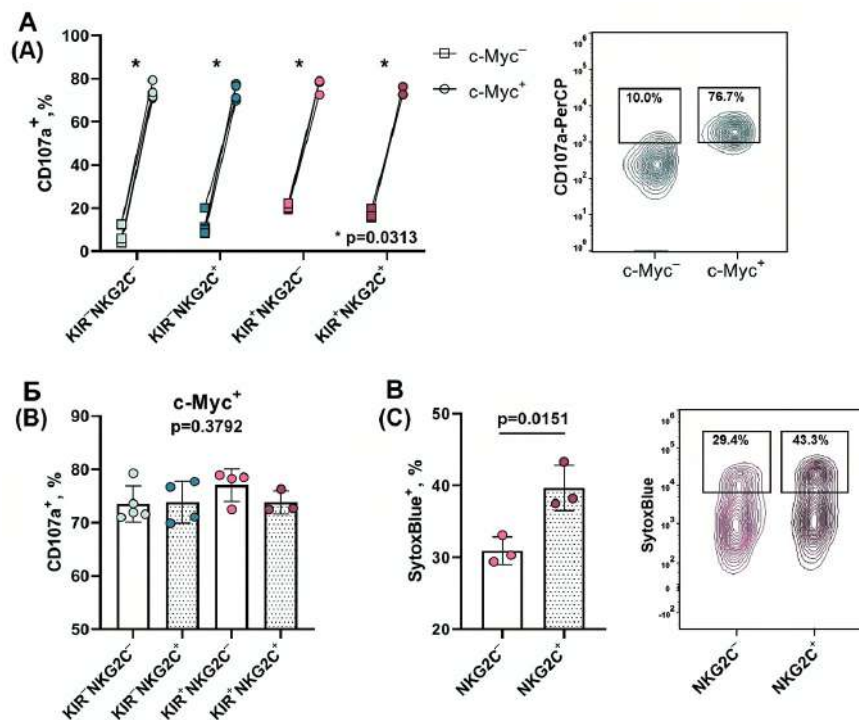


РИС. 2.

Цитотоксическая активность субпопуляций NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C, трансдуцированных геном HER2-CAR, в отношении HER2-экспрессирующих сфероидных культур. **А**–доля дегранулировавших CD107a⁺ NK-клеток нетрансдуцированных (с-Myc⁻) и трансдуцированных (с-Myc⁺) в субпопуляциях с различной экспрессией KIR и NKG2C при коинкубации со сфероидом SKOV-3 (слева), репрезентативные цитометрические данные (справа); **Б**–доля дегранулировавших CD107a⁺ NK-клеток в пуле трансдуцированных с-Myc⁺ клеток в субпопуляциях с различной экспрессией KIR и NKG2C при коинкубации со сфероидом SKOV-3; **В**–доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в сфероиде SKOV-3 после коинкубации с KIR⁺NKG2C⁺/– NK-клетками, трансдуцированными геном HER2-CAR (слева), репрезентативные цитометрические данные (справа).

FIG. 2.

Cytotoxic activity of HER2-CAR gene-transduced NK cell subpopulations with different KIR and NKG2C expression towards HER2-expressing spheroid cultures. **A**–proportion of degranulated CD107a⁺ NK cells, non-transduced (c-Myc⁻) and transduced (c-Myc⁺) in subsets with different KIR and NKG2C expression co-incubated with SKOV-3 spheroids (left), representative cytometric data (right); **B**–proportion of degranulated CD107a⁺ NK cells in the pool of c-Myc⁺ transduced cells in subsets with different KIR and NKG2C expression co-incubated with SKOV-3 spheroids; **C**–the proportion of nonviable SytoxBlue⁺ cells in SKOV-3 spheroids after co-incubation with KIR⁺NKG2C⁺/– NK cells transduced with the HER2-CAR gene (left), representative cytometric data (right).

аллореактивность в отношении клеток донора. Такой подход позволяет установить контроль над клетками лейкемии, и избежать рецидива [17]. Клетки, экспрессирующие KIR, преимущественно относятся к когортам NK1 и NK3, которые отличаются высоким содержанием гранзимов и перфоринов [5]. Кроме того, наличие активирующего рецептора NKG2C позволяет повысить их цитотоксический потенциал в отношении HLA-E-экспрессирующих опухолевых клеток [18, 19]. Дополнительная модификация рецепторами CAR, нацеленными на опухоль-специфичный антиген потенциально увеличит эффективность цитотоксических агентов, коэкспрессирующих KIR и NKG2C. Мы показали, что наибольшая доля нежизнеспособных клеток SKOV-3 наблюдалась в сфероиде, которые коинкубировались с трансдуцированными KIR⁺NKG2C⁺ NK-клетками.

Важно также отметить высокую жизнеспособность таких эффекторов. Клетки, коэкспрессирующие KIR и NKG2C, накапливаются в ходе цитомегаловирусной инфекции, часть из них входит во фракцию адаптивных NK-клеток с высокой продолжительностью циркуляции в организме. Процесс деления NKG2C-экспрессирующих клеток при инфекции HCMV сопровождается накоплением активных форм кислорода и повреждением митохондриальных мембран. Повреждение митохондрий, в свою очередь, индуцирует запуск апоптоза. Однако клетки с высоким потенциалом к аутофагии, в частности, к митофагии, способны элиминировать поврежденные митохондрии и выживать [20]. Таким образом, популяция клеток, ответивших на инфекцию, сокращается, при этом формируется пул клеток памяти с высоким аутофагическим потенциалом. В перспективе такие клетки могут обладать высокой эффективностью в условиях опухолевого микроокружения, где снижены концентрации кислорода и питательных веществ.

NK-клетки высокого уровня дифференцировки, к которым относится и популяция KIR⁺NKG2C⁺, отличаются низкой экспрессией рецепторов к растворимым факторам, в том числе к цитокинам IL-2, IL-15 [5]. Это свойство затрудняет их накопление *in vitro* и усложняет их применение в терапии опухолей. Тем не менее, в настоящее время применяются методы накопления NKG2C⁺ клеток с применением фидерных клеток, экспрессирующих на поверхности HLA-E с пептидом HCMV [21, 22]. При таком способе стимуляции также наблюдается накопление NK-клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C, обладающих высоким цитотоксическим потенциалом против HLA-E-экспрессирующих мишеней [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

NK-клетки, экспрессирующие ингибирующие рецепторы KIR2DL2/3, обладали высоким уровнем дегрануляции в отношении опухолевых сфероидов SKOV-3, не экспрессирующих лиганды KIR2DL2/3. Экспрессия NKG2C на поверхности NK-клеток была сопряжена с высокой чувствительностью к ретровирусной трансдукции, и KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺. NK-клетки,

трансдуцированные геном HER2-CAR, продемонстрировали способность элиминировать HER2⁺ сфероиды опухолевых клеток SKOV-3 с большей эффективностью по сравнению с NKG2C-негативными фракциями. Таким образом, NK-клетки, коэкспрессирующие ингибирующий рецептор KIR и активирующий рецептор NKG2C, могут представлять интерес в контексте создания противораковых CAR-эффекторов.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-75-10136).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Montero A, Ciérvidе R, García-Aranda M, Rubio C. Postmastectomy radiation therapy in early breast cancer: Utility or futility? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;147:102887. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102887
2. Xia W, Chen J, Hou W, Chen J, Xiong Y, Li H, et al. Engineering a HER₂-CAR-NK Cell Secreting Soluble Programmed Cell Death Protein with Superior Antitumor Efficacy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6843. doi: 10.3390/ijms24076843
3. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:283. doi: 10.3389/fimmu.2018.00283
4. Mehta RS, Randolph B, Daher M, Rezvani K. NK cell therapy for hematologic malignancies. *Int J Hematol*. 2018;107(3):262–70. doi: 10.1007/s12185-018-2407-5
5. Rebuffet L, Melsen JE, Escalière B, Basurto-Lozada D, Bhandoola A, Björkström NK, et al. High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity. *Nat Immunol*. 2024;25(8):1474–88. doi: 10.1038/s41590-024-01883-0
6. Rezaeifard S, Talei A, Shariat M, Erfani N. Tumor infiltrating NK cell (TINK) subsets and functional molecules in patients with breast cancer. *Mol Immunol*. 2021;136:161–7. doi: 10.1016/j.molimm.2021.03.003
7. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018;175(7):1731–1743.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.014
8. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795–9. doi: 10.1038/35869
9. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*. 2000;287(5455):1031. doi: 10.1126/science.287.5455.1031

10. Goodridge JP, Jacobs B, Saetersmoen ML, Clement D, Hammer Q, Clancy T, et al. Remodeling of secretory lysosomes during education tunes functional potential in NK cells. *Nat Commun.* 2019;10(1):514. doi: 10.1038/s41467-019-08384-x
11. Haroun-Izquierdo A, Vincenti M, Netskar H, van Ooijen H, Zhang B, Bendzick L, et al. Adaptive single-KIR+NKG2C+ NK cells expanded from select superdonors show potent missing-self reactivity and efficiently control HLA-mismatched acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer.* 2022;10(11):e005577. doi: 10.1136/jitc-2022-005577
12. Alekseeva NA, Boyko AA, Shevchenko MA, Grechikhina MV, Streltsova MA, Alekseeva LG, et al. Three-Dimensional Model Analysis Revealed Differential Cytotoxic Effects of the NK-92 Cell Line and Primary NK Cells on Breast and Ovarian Carcinoma Cell Lines Mediated by Variations in Receptor-Ligand Interactions and Soluble Factor Profiles. *Biomedicines.* 2024;12(10):2398. doi: 10.3390/biomedicines12102398
13. Bonanni V, Antonangeli F, Santoni A, Bernardini G. Targeting of CXCR3 improves anti-myeloma efficacy of adoptively transferred activated natural killer cells. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):290. doi: 10.1186/s40425-019-0751-5
14. He M, Ao X, Yang Y, Xu Y, Liu T, Ao L, et al. Construction of self-driving anti-αFR CAR-engineered NK cells based on IFN-γ and TNF-α synergistically induced high expression of CXCL10. *Neoplasia.* 2024;58:101065. doi: 10.1016/j.neo.2024.101065
15. Frazao A, Messaoudene M, Nunez N, Dulphy N, Roussin F, Sedlik C, Zitvogel L, Piaggio E, Toubert A, Caignard A. CD16⁺NKG2A^{high} Natural Killer Cells Infiltrate Breast Cancer-Draining Lymph Nodes. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(2):208–218. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0085
16. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 1997;7(6):753–63. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80394-5
17. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(5):581–7. doi: 10.1016/j.coi.2008.07.004
18. de Dios O, Ramírez-González MA, Gómez-Soria I, Segura-Collar B, Manosalva J, Megías D, et al. NKG₂C/ KLRC2 tumor cell expression enhances immunotherapeutic efficacy against glioblastoma. *J Immunother Cancer.* 2024;12(8):e009210. doi: 10.1136/jitc-2024-009210
19. Sun Y, Rodgers Furones A, Gultekin O, Khare S, Neo SY, Shi W, et al. Adaptive NK Cells Exhibit Tumor-Specific Immune Memory and Cytotoxicity in Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2025;13(7):1080–97. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-24-0852
20. O'Sullivan TE, Johnson LR, Kang HH, Sun JC. BNIP₃- and BNIP₃L-Mediated Mitophagy Promotes the Generation of Natural Killer Cell Memory. *Immunity.* 2015;43(2):331–42. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.012
21. Rölle A, Meyer M, Calderazzo S, Jäger D, Momburg F. Distinct HLA-E Peptide Complexes Modify Antibody-Driven Effector Functions of Adaptive NK Cells. *Cell Rep.* 2018;24(8):1967–1976.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.069
22. Hammer Q, Rückert T, Borst EM, Dunst J, Haubner A, Durek P, et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol.* 2018;19(5):453–463. doi: 10.1038/s41590-018-0082-6
23. Phan MTT, Kim J, Koh SK, Lim Y, Yu H, Lee M, и др. 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

Сведения об авторах

Алексеева Надежда Алексеевна – аспирант, младший научный сотрудник отдела иммунологии, лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН ГНЦ Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; e-mail: nadalex@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6221-5478>

Стрельцова Мария Алексеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела иммунологии, лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН ГНЦ Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; e-mail: tardes999@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5403-0753>

Коваленко Елена Ивановна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии, лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН ГНЦ Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; e-mail: lenkova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8119-8247>

Information about the authors

Nadezhda A. Alekseeva – postgraduate student, junior researcher of the Department of Immunology, Laboratory of Cellular Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science; e-mail: nadalex@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6221-5478>

Maria A. Streltsova – Cand. Sc. (Biol.), researcher of the Department of Immunology, Laboratory of Cellular Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science; e-mail: tardes999@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5403-0753>

Elena I. Kovalenko – Cand. Sc. (Biol.), senior researcher of the Department of Immunology, Laboratory of Cellular Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science; e-mail: lenkova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8119-8247>

Статья опубликована в рамках VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ», 22–24 июня 2026 г.