

## НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ НК-КЛЕТОК

Воробьева И.Г.<sup>1</sup>, Абакушина Е.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Текон МП», Москва, Россия

<sup>2</sup> ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Одна из основных сложностей терапии солидных опухолей связана с разнообразием и быстрой адаптацией механизмов иммуносупрессии, проявляемых клетками иммунитета, перепрограммированных опухолью. Ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ), нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, теряют способность защищать здоровые ткани и перестают уничтожать злокачественные клетки, активируя арсенал средств для блокады иммуннадзора и терапевтических воздействий. Привлеченные хемокинами и перепрограммированные опухолью клетки иммунитета снабжают злокачественные клетки недостающими питательными веществами (например, производя аргиназу), поддерживают выживание новых «рекрутов» при низком рН (ацидозе) вокруг малигнизированных тканей, производят повышенное количество ангиогенных факторов, способствуя усилению кровоснабжения опухоли. Продуктивное воспаление — как один из главных типов иммунного ответа, уничтожающий опухолевые патогены при прогрессировании опухолевого процесса, переходит в хроническое воспаление, что вызывает иммуносупрессию. Восстановление воспалительных иммунных реакций после резекции опухоли, химиотерапии, радиотерапии необходимо для достижения ремиссии без рецидива или как минимум увеличения времени до следующего эпизода возникновения признаков прогрессирования болезни.

НК-клеточный трансплантат имеет ряд преимуществ перед Т-лимфоцитами, для восстановления продуктивного воспаления, однако и он требует дополнительных терапевтических воздействий, так как разнообразные механизмы иммуноускользания блокируют противоопухолевый иммунитет. Для выраженного терапевтического эффекта важно соотношение между активностью и количеством НК-клеток, поддерживающих их терапевтических средств, и агрессивностью и распространением самой опухоли. Одно из разрабатываемых направлений, поддерживающих НК-клетки — это создание «усилителей» (НКСЕ) — инженерных белков, и делающих клеточную терапию более селективной и адресной. НКСЕ может активировать целевую миграцию НК-клеток одновременно блокируя ингибирующие лиганды. Блокада ингибирующих сигналов для борьбы с метастатическими опухолями изучается в настоящее время для рецепторов KIR, NKG2A, TIGIT, TIM-3, EGFR, PD1 и PDL1, лигандов NKG2D, что описано в ряде исследований. Повышение специфичности терапии также достигается за счет использования антител нового поколения — наноантител, направленной блокировки экзосом злокачественного происхождения (ТДЕ), а также доменов некоторых белков, усиливающих целевую миграцию НК-клеток, и терапевтических наночастиц.

**Ключевые слова:** НК-клетки, белок-усилитель НК-клеток, мультиспецифические антитела, наноантитела, целевая миграция, ингибирование контрольных точек

### Адрес для переписки:

Воробьева Ива Глебовна  
ООО «Текон МП»  
123298, Россия, Москва,  
ул. 3-я Хорошевская, 16, корп. 1, стр. 1.  
E-mail: iva1647@yandex.ru

### Address for correspondence:

Iva G. Vorobyova  
LLC “Tecon MP”  
16 3<sup>rd</sup> Khoroshevskaya St, Bldg 1  
Moscow  
123298 Russian Federation  
E-mail: iva1647@yandex.ru

### Образец цитирования:

И.Г. Воробьева, Е.В. Абакушина «Новые стратегии иммунотерапии солидных опухолей на основе НК-клеток» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1163-1176.  
doi: 10.15789/1563-0625-NSF-2938

© Воробьева И.Г., Абакушина Е.В., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

I.G. Vorobyova, E.V. Abakushina “New strategies for solid tumor immunotherapy based on NK cells”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1163-1176.  
doi: 10.15789/1563-0625-NSF-2938

© Vorobyova I.G., Abakushina E.V., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-NSF-2938

## NEW STRATEGIES FOR SOLID TUMOR IMMUNOTHERAPY BASED ON NK CELLS

Vorobyova I.G.<sup>a</sup>, Abakushina E.V.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> LLC "Tecon MP", Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** A major issue in treatment of solid malignancies is associated with multiplicity and rapid adaptation of immunosuppressive effects exerted by immune cells reprogrammed by the tumor. Tumor-associated macrophages (TAM), neutrophils, and tumor-infiltrating lymphocytes lose their ability to protect healthy tissues and to destroy malignant cells by activating a number of tools causing blockage of immune surveillance and reduction of therapeutic effects. Immune cells attracted by chemokines and reprogrammed by the tumor supply the malignant cells with missing nutrients (e.g., by producing arginase), support the survival of *de novo* recruited cells at low pH (acidosis) around malignant tissues, produce increased amounts of angiogenic factors thus contributing to increased blood supply to the tumor. Productive inflammation, being among the main types of immune response, destroys tumor pathogens and moves into chronic inflammation with progression of the tumor, thus causing immune suppression. Restoration of inflammatory immune reactions after tumor resection, chemotherapy, and radiotherapy is necessary to achieve remission without relapse or, at least, increases the time period until next episode of the disease progression.

Transplantation of NK cells has a number of advantages over T lymphocytes in order of restored productive inflammation. However, it also requires additional therapeutic impacts, since various mechanisms of tumor immune escape block anti-tumor immunity. To achieve a pronounced therapeutic effect, the optimal ratio is important between the activity and number of NK cells, supporting therapeutic agents, with regard of aggressiveness and spread of malignant tumor. Among the developing areas of NK cells support, one may consider the NK cell "enhancers" (NKCE), engineered proteins that make cell therapy more selective and targeted. NKCE may activate the targeted migration of NK cells, along with blockage of inhibitory ligands. Currently, the blockage of inhibitory signals is studied in order to control metastatic tumors via KIR, NKG2A, TIGIT, TIM-3, EGFR, PD1 receptors, PDL1 and NKG2D ligand, as reported in a number of clinical and preclinical trials. The increased specificity of therapy is also achieved by usage of new-generation antibodies – nanoantibodies, aimed for targeted blocking of tumor-derived exosomes (TDE), as well as protein domains that enhance targeted migration of NK cells and therapeutic nanoparticles.

*Keywords:* NK cells, NK enhancer protein, multispecific antibody, nanoantibody, targeted migration, control point inhibition

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно – технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15- 2022-310.

### Введение

**НК-терапия как безопасный способ клеточной терапии солидных опухолей**

Одна из основных сложностей терапии солидных опухолей связана с разнообразием и быстрой адаптацией механизмов иммуносупрессии, проявляемых клетками иммунитета, перепрограммированных опухолью. Ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, теряют способность защищать здоровые ткани и перестают уничтожать злокачественные клет-

ки, активируя арсенал средств для блокады иммунонадзора и терапевтических воздействий. Привлеченные хемокинами и перепрограммированные опухолью клетки иммунитета снабжают злокачественные клетки недостающими питательными веществами (например, производя аргиназу), поддерживают выживание новых «рекрутов» при низком pH (ацидозе) вокруг малигнизированных тканей, производят повышенное количество ангиогенных факторов, способствуя усилению кровоснабжения опухоли [23]. Продуктивное воспаление – как один из главных типов иммунного ответа, уничтожающий опухолевые патогены, переходит в хроническое воспаление, что вызывает иммуносупрессию [6]. При лечении солидных опухолей необходимо восстановление воспалительных иммунных реакций после резекции опухоли, химиотерапии, радиотерапии для достижения ремиссии без рецидива или, как минимум, увеличения времени до следующего эпизода возникновения признаков прогрессирования болезни.

Для преодоления этих негативных свойств тестируется множество методов, в том числе в стадии клинических испытаний, включая использование цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), эпигенетическое ингибирование TGF- $\beta$  и AHR, таргетное воздействие на молекулы, привлекающие НК-клетки, использование генных каркасов, разнообразных наночастиц, инженерные модификации самих клеток (CAR-NK), ингибиторы иммунных контрольных точек и другие (табл. 1). Обзор посвящен разрабатываемым методам генной и клеточной инженерии, помогающим аутологичным НК-клеткам преодолеть барьеры солидных опухолей.

#### **Преимущества в безопасности НК-клеток относительно Т-лимфоцитов**

Для восстановления иммунных функций, клеточная терапия на основе НК-лимфоцитов все чаще рассматривается как эффективный и безопасный способ лечения [28]. Известно, что в уничтожении инфицированных и опухолевых клеток ведущая роль принадлежит цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL) и НК-клеткам. Оба эти типа клеток-убийц могут образовывать цитотоксические иммунологические синапсы – связи между лигандом на злокачественной клетке и рецептором на иммунной клетке. Связавшись активирующим рецептором с лигандом на патогенной клетке и не получив значимого сигнала от своих ингибирующих рецепторов, иммунная клетка уничтожает свою мишень [22]. Активация Т-лимфоцитов, их пролиферация, секреция цитокинов воспаления происходят, когда клональный рецептор Т-клеток (TCR) связывается с опухолевым антигеном, представленным в комплексе с HLA-I класса. В отличие от Т-лимфоцитов, НК-клетки не экспрессируют TCR, но вместо этого имеют много активирующих рецепторов – распознающих патогены, и ингибирующих рецепторов – распознающих основные комплексы MHC-I класса, чтобы не атаковать собственные, здоровые клетки [26]. Экспрессия молекул MHC-I часто подавляется в злокачественных клетках, из-за чего они не могут быть уничтожены Т-лимфоцитами, зато отсутствие комплекса гистосовместимости позволяет ликвидировать такой патоген НК-клетке. Поэтому НК-клеточный трансплантат имеет преимущества перед использованием Т-лимфоцитов как в безопасности, так и эффективности.

#### **Источники НК-клеток для трансплантации**

Для применения в клинической практике, производство клеточного продукта должно соответствовать нормам GMP – иметь строгий уровень доказательной базы, воспроизводимость, безопасность, контроль качества [17]. Документация необходима как на источник получения НК-клеток, так и на технологии культивирования, активации и схемы лечения. Источниками НК-клеток для терапии служат: мононуклеары

периферической крови (PBMC), пуповинной крови (CB); дифференцировка НК-клеток из пуповинной крови (CB), костного мозга (BM), стволовых клеток (hESC) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS).

#### **Аутологичный и аллогенный клеточный продукт**

По типу донора источники клеток для противоопухолевой терапии делятся на: аутологичные – клетки самого пациента и аллогенные – клетки донора [4]. Любой из этих клеточных продуктов может быть не лишен примеси Т-лимфоцитов. Аутологичный клеточный продукт имеет такое важное преимущество перед аллогенным, как повышенная безопасность из-за заведомого отсутствия реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) – потенциально опасного состояния, вызванного разрушением тканей хозяина донорскими Т-клетками [38]. Также донорные клетки могут быть не свободны от латентных вирусов, которых нет у пациента, что также создает потенциальную угрозу для пациента и исхода терапии.

Недостатки аутологичного продукта, выделенных из крови пациента мононуклеаров – это сниженное количество лимфоцитов после химиотерапии (лимфоцитопения), зачастую измененная цитотоксичность и пролиферативная активность. Обедненный потенциал НК-клеток ухудшает возможности аутологичного клеточного продукта, о чем свидетельствуют клинические испытания аутологичной НК-клеточной иммунотерапии солидных опухолей [21]. Такие свойства появляются у НК-клеток из-за иммуносупрессии, вызванной ростом опухоли или после проведения химиотерапии [41].

#### **Способы активации и генерации НК-клеточной популяции**

НК-клеточный продукт как аутологичный, так и аллогенный, нуждается в стандартизованных методиках экспансии и активации *in vitro*. Количество и качество выделяемых естественных киллеров из периферической крови пациентов или доноров может страдать из-за иммуносупрессии и/или ограниченного количества биоматериала. Для генерации используют несколько цитокинов, таких как интерлейкины IL-2/IL-15 и их модификации, IL-12, IL-21 и IL-18, IFN $\gamma$ , а также фидерные (кормящие) клеточные линии [10].

Интерлейкины IL-2 и IL-15 тестировались для получения клеточного продукта в лаборатории, а также для инфузии совместно с НК-клетками, влияя на весь пул естественных киллеров пациента (NCT02118415, NCT03539406, NCT03539406). Инфузии НК со стимулирующими дозами IL-2 при трансплантации показали не только экспансию естественных киллеров, но и несколько побочных эффектов, таких как синдром капиллярной утечки [36], апоптоз НК-клеток при контакте с эндотелием сосудов, активация иммуносупрессирующих Т-лимфоцитов (Treg), которые, так же как НК, экспрессируют CD25 рецептор к

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТРАТЕГИЙ НК-ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

TABLE 1. CLINICAL TRIALS OF VARIOUS STRATEGIES FOR NK THERAPY OF SOLID TUMORS

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Гастроинтестинальная стромальная опухоль Gastrointestinal stromal tumor	Смесь DC и НК-клеток A mixture of DC and NK cells	NCT05461235
Солидные опухоли Solid tumors	Аутологичные НК-клетки Autologous NK cells	NCT05143125
Рак яичников IV стадии Рецидивирующий рак эндометрия Ovarian cancer IV stage Recurrent endometrial cancer	Аутологичные CAR НК-клетки Autologous CAR NK cells	NCT05410717
Рак поджелудочной железы Немелкоклеточный рак легкого метастазирующий Рецидивирующая карцинома печени Pancreatic cancer Metastatic non-small cell lung cancer Recurrent liver carcinoma	НК с необратимой электропорацией (ИРЭ) Аутологичные CIK NK with irreversible electroporation (IRE) Autologous CIK	NCT02718859 NCT02843815 NCT02845856 NCT03008343
Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	Аутологичные НК-клетки Autologous NK cells	NCT03958097
Мелкоклеточный рак легкого Small Cell Lung Cancer	Аутологичные естественные клетки-киллеры Autologous NK cells	NCT03410368
Рефрактерный метастатический колоректальный рак Refractory metastatic colorectal cancer	NKG2D CAR-NK	NCT05213195
Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	Аллогенные НК-клетки пуповинной крови + химиотерапия Allogeneic NK cells of umbilical cord blood + chemotherapy	NCT05171309 NCT04162158
Рак яичников Ovarian cancer	Антимезотелиновые CAR НК-клетки Anti-mesothelin CAR NK cells	NCT03692637
Солидные опухоли Solid tumors	Аллогенные НК Allogeneic NK cells	NCT03619954
Прогрессирующий рак желудка Рак желудочно-кишечного тракта Progressive stomach cancer Cancer of the gastrointestinal tract	Гаплоидентичные UCB-НК-клетки Allogeneic UCB-NK cells haploidentical donor	NCT04385641
Рак почки Kidney cancer	Аллогенные НК-клетки Allogeneic NK cells	NCT02843607
Прогрессирующий рак Advanced neoplasms	Аутологичные НК-клетки Autologous NK cells	NCT03554889
Немелкоклеточный рак легкого Колоректальный рак Плоскоклеточный рак головы и шеи Non-small cell lung cancer Colorectal cancer Squamous cell carcinoma of the head and neck	Аутологичные активированные цитокинами CIK-НК <i>ex vivo</i> (SNK01) Autologous cytokine-activated CIK-NK <i>ex vivo</i> (SNK01)	NCT05099549 NCT03941262 NCT04464967
Опухоли головного мозга у детей Pediatric brain tumors	Аллогенные CIK NK TGF- $\beta$ i CIK NK TGF- $\beta$ i Allogeneic CIK NK TGF- $\beta$ i CIK NK TGF- $\beta$ i	NCT05887882

Таблица 1 (продолжение)  
Table 1 (continued)

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
<b>Прогрессирующая почечно-клеточная карцинома</b> <b>Прогрессирующая мезотелиома</b> <b>Прогрессирующая остеосаркома</b> Progressive renal cell carcinoma Progressive mesothelioma Progressive osteosarcoma	<b>(CAR)-трансдуцированные НК-клетки</b> (CAR)-transduced NK cells	NCT05703854
<b>Рецидивирующая глиосаркома</b> <b>Рецидивирующая супратенториальная глиобластома</b> <b>Супратенториальная глиосаркома</b> Recurrent gliosarcoma Recurrent supratentorial glioblastoma Supratentorial gliosarcoma	<b>Аллогенные НК, полученные из пуповинной крови, НК-клетки, содержащие удаленные TGF-βR2 и NR3C</b> Allogeneic NK cells derived from umbilical cord blood, NK cells containing deleted TGF-βR2 and NR3C	NCT04991870
<b>HER2-положительный рак желудка</b> <b>HER2-положительный метастатический рак молочной железы</b> HER2-positive stomach cancer HER2-positive metastatic breast cancer	<b>ACE1702 (анти-HER2 oNK) клетки</b> ACE1702 (anti-HER2 oNK)	NCT04319757
<b>Плоскоклеточный рак головы и шеи</b> <b>Рецидивирующий плоскоклеточный рак головы и шеи</b> Squamous cell carcinoma of the head and neck Recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck	<b>Аллогенные НК CIML от гаплоидентичного донора</b> Allogeneic NK CIML from a haploidentical donor	NCT04290546
<b>Глиома</b> Glioma	<b>Аллогенные НК от гаплоидентичного донора</b> Allogeneic NK cells haploidentical donor	NCT04254419
<b>Рак яичников, фаллопиевых труб или первичный рак брюшины</b> Ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer	<b>Аллогенные естественные клетки-киллеры, подобные CTL</b> Allogeneic natural killer cell-like CTLs	NCT03735589
<b>Прогрессирующая солидная опухоль</b> Solid tumors	<b>Аллогенные НК-клетки гаплоидентичные</b> Allogeneic NK cells haploidentical donor	NCT04106167
<b>Нейробластома</b> Neuroblastoma	<b>Аллогенные НК-клетки гаплоидентичные</b> Allogeneic NK cells haploidentical donor	NCT01857934 NCT01576692
<b>Плоскоклеточный рак головы и шеи</b> <b>Метастатический колоректальный рак</b> Squamous cell carcinoma of the head and neck Metastatic colorectal cancer	<b>WU-NK-101 – неинженерная НК-клетки из PBMC, Аллогенные CIK NK</b> WU-NK-101 – Non-engineered NK cells from PBMC, Allogeneic CIK NK	NCT05674526
<b>Детская остеосаркома</b> Pediatric osteosarcoma	<b>Аллогенные НК импринтинг-β (TGF-βi) во время активации и экспансии НК-клеток</b> Allogeneic NK imprinting-β (TGF-βi) during activation and expansion of NK cells	NCT05634369

Таблица 1 (продолжение)  
Table 1 (continued)

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Карцинома толстой кишки Аденокарцинома прямой кишки Миелопролиферативные синдромы Саркома Юинга Colon carcinoma Adenocarcinoma of the rectum Myeloproliferative syndromes Ewing sarcoma	Аллогенные NK HLA-совместимые в комбинации с ALT-803 Allogeneic NK HLA-compatible in combination with ALT-803	NCT02890758
Рецидивирующая или рефрактерная нейробластома Рецидивирующая или рефрактерная остеосаркома Recurrent or refractory neuroblastoma Recurrent or refractory osteosarcoma	CIK K562-mbIL15-41 млн аллогенных NK-клеток от гаплоидентичного донора CIK K562-mbIL15-41 млн CIK K562-mbIL15-41BBL allogeneic NK cells haploidentical donor CIK K562-mbIL15-41BBL	NCT03209869
Нейробластома Neuroblastoma	Аллогенные NK гаплоидентичные с IL-2 Allogeneic NK haploidentical with IL-2	NCT00698009
Новообразования по гистологическому типу Мультиформная глиобластома Neoplasms by histological type Glioblastoma multiforme	NK-клетки, полученные из плацентарных CD34 <sup>+</sup> клеток человека NK cells derived from human placental CD34 <sup>+</sup> cells	NCT04309084 NCT04489420
Нейробластома костного мозга, Нейробластома Bone marrow neuroblastoma, Neuroblastoma	Гуманизированное антитело к GD2 Hu3F8 и аллогенных естественных клеток-киллеров Humanized antibody to GD2 Hu3F8 and allogeneic natural killer cells	NCT02650648 NCT00877110
Нейробластома Neuroblastoma	Аутологичные NK-клетки в сочетании со стандартной дозировкой динутуксимаба Autologous NK cells in combination with the standard dosage of dinutuximab	NCT02573896
Остеосаркома, саркома Юинга, нейробластома, рабдомиосаркома, опухоли ЦНС Osteosarcoma, Ewing's Sarcoma, Nephroblastoma, Rhabdomyosarcoma, Central Nervous System Tumors	Иммунотерапии солидных опухолей с использованием HLA- гаплоидентичного трансплантата и донорских NK Immunotherapy of solid tumors using HLA- haploidentical graft and donor NK	NCT02100891
Рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома Recurrent/refractory multiple myeloma	Аллогенные NK-клетки (GIC-102) Allogeneic NK cells (GIC-102)	NCT05880043
Саркома мягких тканей Остеосаркома Саркома Юинга Гепатоцеллюлярная карцинома Soft-Tissue Sarcoma Osteosarcoma Ewing's sarcoma Hepatocellular carcinoma	Гаплоидентичные стволовые и NK-клетки Allogeneic stem and NK cells haploidentical donor	NCT01807468 NCT02008929
Рак желчевыводящих путей Biliary tract carcinoma	Аллогенные NK-клеток (SMT-NK) в комбинации с пембролизумабом Allogeneic NK cells (SMT-NK) in combination with pembrolizumab	NCT03937895

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) Non-small cell lung cancer (NSCLC)	<b>PB103 представляет собой аллогенные НК-клетки, полученные от здорового донора</b> PB103 is an allogeneic NK cell obtained from a healthy donor	NCT04616209
Рак толстой кишки I стадии Colon cancer stage I	<b>Аутологичные CIK НК-клетки</b> Autologous CIK NK cells	NCT05394714
Рецидивирующая мультиформная глиобластома Recurrent glioblastoma multiforme	<b>Аутологичные CIK НК-клетки</b> Autologous CIK NK cells	NCT05108012
Новообразования молочной железы Breast neoplasms	<b>Инфузии активируемых <i>ex vivo</i> аллогенных НК-клеток</b> Infusions of <i>ex vivo</i> activated allogeneic NK cells	NCT05385705
Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) на стадиях III A и III B Non-small cell lung cancer на стадиях III A и III B	<b>CIK активированные аутологичные НК-клетки</b> Autologous CIK-NK cells	NCT02118415
Солидные опухоли Solid tumors	<b>Аутологичные НК-клетки</b> Autologous NK cells	NCT05237206
Саркома Юинга Рабдомиосаркома Ewing's sarcoma Rhabdomyosarcoma	<b>Активированные гаплоидентичные НК-клетки</b> Autologous CIK-NK cells haploidentical donor	NCT02409576

IL-2 [2]. IL-15 также активирует жизнеспособность и пролиферацию НК-клеток и защищает их от активационно-индуцированной гибели (AICD) и имеет меньше побочных эффектов, чем IL-2. Однако было показано, что для получения значительных противоопухолевых эффектов требуются высокие дозы IL-15 [8].

Монотерапия IL-12 стимулирует продукцию  $IFN\gamma$  в НК-клетках и активирует апоптоз злокачественных клеток через индукцию TRAIL-/FasL [30]. Стимулированная повышением титра  $IFN\gamma$  воспалительная реакция подавляет экспрессию TGF- $\beta$  и IL-10 в клетках TME [5].

IL-21 описывают как один из цитокинов, активирующих противоопухолевый иммунитет НК-клеток. Он способствует экспрессии генов, запускающих воспалительные реакции, и дифференцировку НК-клеток в цитотоксические  $CD56^{dim}/CD16^{+}$  [18]. Однако эффективность IL-21 в монотерапии оказалась ниже, чем предполагалось, поэтому он используется в схемах для лечения злокачественных новообразований в сочетании с другими цитокинами [44].

Альтернативой естественным цитокинам, как инженерное решение, был сконструирован химерный рекомбинантный белок ALT-803, который нарабатывается в клетках CHO [20] и представляет собой растворимый комплекс про-

теинов, состоящий из 2 вариантов IL-15 человека, связанный с димерным доменом рецептора IL-15R слитым с Fc-частью иммуноглобулина G1 (IgG1) человека. В проведенных клинических испытаниях (NCT02890758) ALT-803 поддерживал терапию аллогенными НК-клетками у пациентов с рецидивом. Показано, что ALT-803 стимулирует активацию и пролиферацию НК-клеток, не оказывая значительного влияния на увеличение количества Treg в крови пациента, а следовательно, не вызывая иммуносупрессию. По результатам испытаний 19% из 33 пациентов показали положительный результат терапии, включая одну полную ремиссию продолжительностью 7 месяцев (NCT01885897). Нежелательными явлениями были симптомы, связанные с временным повышением сывороточного IL-6 и  $IFN\gamma$  после внутривенного введения [24].

Активную пролиферацию и дифференцировку НК-клеток в средах для культивирования получили, используя фидерные клеточные линии. Преимущества перед методами добавления только цитокинов показывают более высокие уровни НК-клеток в крови после инфузии и повышенную цитотоксичность НК-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Чаще всего для получения фидерных клеток используют линию K562 и созданные на ее основе генно-инженерные клетки, экспресси-

рующие химерные белки, состоящие из доменов цитокинов и молекул адгезии для экспонирования на клеточной мембране. Генно-инженерные фидерные линии созданы с повышенной экспрессией мембрано-связанных химерных рецепторов молекул IL-2 и IL-15, а также IL-12, IL-21 и IL-18. Клинические испытания (NCT03209869) генерированных NK-клеток с использованием таких методов совместного культивирования показывают их высокую эффективность.

#### **Антитела как инженерный вариант преодоления злокачественной иммуносупрессии**

Методики успешных клинических испытаний NK-терапии примененные к неоплазиям крови невозможно перенести на схемы лечения солидных опухолей из-за защиты опухоли микроокружением (ТМЕ). Поэтому одно из разрабатываемых направлений иммунотерапии – это создание «усилителей» или биологических инженерных решений, поддерживающих NK-терапию и делающих ее более селективной и адресной. Инженерные рекомбинантные белки направлены взаимодействуют с мишенями киллеров, блокируя ингибирующие сигналы опухоли или увеличивая вероятность образования иммунологических синапсов.

#### **Антитела – усилители NKCE**

Разработаны антитела – усилители (NKCE), состоящие из разных фрагментов моноклональных антител (mAbs). Эти фрагменты – эпитопы различных антител, а также доменов, связывающих «усилитель» с клеткой-киллером. Для этих целей используют эпитопы антител и связывающие домены белков: CD16, CD20, CD33, PD1 и PDL1, TRAIL/FasL, специфичные для злокачественных клеток лиганды MICA/B, HER-2/neu, SEA, MAGE 2, MAGE 3 и p53 [9]. Такие химерные белки могут взаимодействовать с несколькими лигандами на поверхности клетки и, следовательно, лучше удерживаться и «помечать» злокачественную клетку для белкового синапса с NK-клетками. Такие антитела обозначаются в соответствии с количеством доменов как биспецифические (BiKE), триспецифические киллеры (TriKE) или как усилители ROCK-engagers.

Антитела BiKE содержат два одноцепочечных переменных фрагмента и были разработаны для связывания с молекулой CD16 и опухолевыми антигенами. Антитела TriKE (NCT03214666) с тремя фрагментами scFv также необходимы для связи с CD16, опухолевым антигеном и содержат фрагмент IL-15 человека. Трифункциональные МАВ состоят из фрагментов, нацеленных на CD16, NKp46 и ассоциированных с опухолью антигенов CD19, CD20 или EGFR. Например, NKCE, состоящий из домена NKp46, который взаимодействует с опухолевым лигандом NKp44L, фрагмент, связывающийся с CD16 и опухолевый антиген (ТА) (NKp46/CD16А/ТА), показал большую противоопухолевую эффек-

тивность относительно ксенотрансплантатов В-клеточной лимфомы у мышей, чем МАВ-индуцирующие ADCC, только через рецептор CD16 на NK-клетках.

Также проходят клинические испытания химерные четырехвалентные антитела (NCT05883449, NCT04074746, NCT02321592, NCT02665650, NCT05883449). Так, AFM13 является первым четырехвалентным биспецифическим белком, состоящим из фрагментов антител к CD30/CD16A для иммунотерапии лейкозов NK-клетками [43]. Одно плечо AFM13 связывается с антигеном CD30 на опухолевых клетках, а другое – с антигеном CD16A на NK-клетках. Специфика этого инженерного белка не позволяет использовать его для солидных опухолей, которые не экспрессируют CD30.

Задачи, на решение которых направлено создание таких химерных молекул, можно разделить на три группы. Первая – неспецифичность терапии – разнообразные побочные эффекты, связанные с распознаванием и элиминацией структур трансплантата, в том числе приводящее к дополнительной разбалансировке работы иммунной системы. Вторая – преодоление иммуносупрессии ТМЕ и связанное с ней отсутствие или критичное снижение миграции терапевтических клеток к опухоли, а также изменение их активности, цитотоксичности при взаимодействии с опухолью и ее окружением. Третья – нестабильность или быстрая утилизация таких дополнительных компонентов NK-клеточного продукта, как полноразмерные антитела, а также их низкая способность проникать в строму опухоли.

Неспецифичность терапии может быть связана как с самим индивидуальным типом рака – экспрессией лигандов на злокачественных клетках, на которые нацелена терапия, так и с общими механизмами защиты опухоли иммуносупрессивным микроокружением, включая подавление экспрессии лиганда, что приводит к «нецелевой» терапии МАТ. Также неспецифичный иммунный ответ могут вызвать любые компоненты терапии, которые иммунная система пациента будет воспринимать как чужеродные. Организм пациента при введении в кровь рекомбинантных белков может распознавать их как антигены и вырабатывать на них иммунную защиту – антитела на препарат. Количество вырабатываемых антител зависит от размера, аминокислотного состава, строения и размера белка. Большие рекомбинантные белки со сложными эпитопами могут быть более удачной целью для аффинного связывания с антителом и, следовательно, вызывать более сильную иммунную реакцию. Для снижения такой реакции при дизайне белковых компонентов терапии обращают внимание на длину белковой цепи, аминокислотный состав, наличие чужеродных для организма человека сахаров



(например фукозы), аффинность к целевым и нецелевым лигандам, стабильность конструкции.

#### **Наноантитела**

Средний вес полноразмерных антител плацентарных млекопитающих около 150 kDa. Хрящевые рыбы вырабатывают антитела только с тяжелой цепью, эти антитела и названы наноантителами и обозначаются V<sub>HN</sub>. Верблюды, ламы и альпаки вырабатывают кроме полноразмерных антител также иммуноглобулины только с тяжелой цепью. Наноантитела имеют размеры в 4-10 раз меньше, чем полноразмерные, уровень распознавания иммунной системой такого белка, выделенного из сыворотки верблюда, значительно ниже, чем МАВ, выделенного из сыворотки мыши, благодаря аминокислотному составу, близкому к составу антител человека. Кроме размера, такие наноантитела имеют ряд преимуществ перед полноразмерными иммуноглобулинами. Даже участок, непосредственно связывающийся с эпитопом целевого лиганда (Fab-фрагмент), имеет большие размеры и менее стабилен, чем вариабельный фрагмент белков иммунной защиты. Они значительно стабильнее, не теряют биологической активности несколько суток, в отличие от традиционных из-за более простой структуры, отсутствия гликозилирования (сахара не отщепляются в процессе «жизни» белка в крови, не изменяя его свойства), мономерной димеризации. Показано, что наноантитела активно инфильтрируют строму опухоли, при этом значительно меньше распознаются иммунной системой. Некоторые из проходящих клинические испытания наноантител показывают сниженную иммунную реактивность относительно полноразмерных антител, даже при повторных введениях [45]. Так, клинические испытания NCT03214666 при наличии положительных результатов были прекращены «в связи с разработкой второго поколения препарата TriKE на основе верблюдовых наноантител».

Второй вариант снижения иммуногенности инженерного белка «усилителя» — использование в конструкции генетических последовательностей доменов белков *homo sapiens*, связывающихся с лигандами опухоли. К таким доменам относят: NKG2D, NKp46, NKp30 (NCT05734898, NCT03415100, NCT05213195, NCT02615665). NKCE, включающие такие домены антитела, проходят клинические и доклинические испытания. Кроме размера и стабильности на эффективность действия антител в строме опухоли влияет экспрессия лигандов на злокачественных клетках. Например, NKCE может воздействовать на опухоль, блокируя или используя для активизирующего связывания лиганды, ингибирующие NK-клетки.

#### **Инженерия Fc-фрагмента антител**

Большинство инженерных NKCE для связи с NK-клетками содержат Fc-участок антитела,

который состоит из нескольких доменов, CH3, CH2, и, в зависимости от строения и сочетания структурных единиц, связывается с разными рецепторами иммунных клеток. Рецептор Fc-фрагментов антитела (FcR) подразделяется на несколько видов, в зависимости от типа антитела, которое распознают. Fc-гамма-рецепторы (FcγR) — одни из основных доменов, распознающих иммуноглобулины гамма. Они расположены на внешней мембране клетки, и этот тип рецепторов включает несколько видов, характерных для клеток иммунитета: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) [14]. Fcγ-рецепторы отличаются своим сродством к Fc-участку IgG. Стабильность и распознавание Fc-рецептором участка иммуноглобулина также зависит от сахара, связанного с CH2 участком Fc-области полноразмерного IgG. Фукоза снижает сродство IgG к FcγRIII, а N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) повышает адгезию к FcγRIII. Активация FcγRIII IgG вызывает высвобождение IFNγ, перфорина и гранзима — белков, которые попадают в клетку-мишень и вызывают ее апоптоз [34]. Такой тип реакции называется антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Однако удачные инженерные решения, изменившие аминокислотный состав Fc-фрагмента, которые позволили в десятки раз повысить ADCC, как оказалось, несут высокие клинические риски. Описано, что все пациенты, участвующие в исследовании I фазы безопасности моноклонального антитела против CD28 TGN1412, погибли от цитокинового шторма [37]. Апробирование новых, безопасных инженерных вариантов связывания с рецептором CD16 NK-клеток поддерживает ряд клинических испытаний: NCT04551885, NCT04630769, NCT05069935, NCT04050709, NCT04927884. Однако если FcγRIII на NK-клетках распознает IgG, который не связан с антигеном, происходит ингибирование активности NK-клетки. Поэтому присутствие избыточного количества антител *in vitro* или *in vivo*, которые не «нашли» нужный агент на трансформированных клетках, будут подавлять активность клеток иммунитета. При целевом взаимодействии антитела с лигандами злокачественной клетки усиливается противоопухолевая активность иммунной системы.

NKG2D служит одним из основных активирующих рецепторов NK-клеток, который принимает участие во взаимодействии с клеткой-мишенью. Лигандами рецептора NKG2D являются белки, связывающиеся с экспонированными на поверхности клетки молекулами MHC I, MICА/MICВ и UL16-связывающимися белками (ULBP-1- ULBP-6) [32]. Эти лиганды почти отсутствуют в здоровых тканях, но их экспрессия индуцируется такими процессами, как повреждение ДНК, тепловой шок или злокачественная трансформация. При прогрессировании опухоли повышенная экспрессия лигандов рецептора

NKG2D и другие механизмы ускользания от иммунного надзора способствуют появлению высоких титров растворимых форм молекул sMICA/V в крови, что ассоциировано с плохим прогнозом [42]. Лиганды NKG2D рассматриваются в том числе как мишени для таргетной терапии, из-за чего использование этого рецептора входит в дизайн ряда клинических испытаний с участием модифицированных Т-клеток (NCT05248048, NCT05213195, NCT04623944) и испытания (NCT05462873) с усилителями NK-клеточной терапии.

Блокада ингибирующих сигналов для борьбы с метастатическими опухолями (рецепторы KIR (NCT01248455), NKG2A [1], TIGIT (NCT05327530), TIM-3 [7], EGFR (NCT05597839) и PD1 (NCT05461235, NCT05069935, NCT02843204) также изучается в ряде клинических и доклинических испытаний.

Для решения второй задачи – преодоление иммуносупрессии ТМЕ – в инженерную конструкцию вводят элементы, способные помочь NK-трансплантату преодолеть защитные механизмы опухоли, сбивающие хемокиновую систему «самонаведения», отвечающие за миграцию иммунных клеток и их проникновение в строму опухоли. Подавление активности экспрессии таких белков, как TGF- $\beta$  и AHR в ткани опухоли, исследуется в ряде клинических испытаний.

Фактор TGF- $\beta$  способен ключевым образом снижать продуктивное воспаление, подавлять цитотоксические свойства иммунных клеток, усиливать фиброз тканей, что создает механические препятствия для инфильтрации терапевтическими средствами опухоли [39]. Поэтому элементы терапии против TGF- $\beta$  также часто включаются в дизайн иммунотерапии. К клиническим испытаниям таких конструкций можно отнести: NCT04991870 – исследование делеций рецептора TGF- $\beta$  в инженерных NK-клетках, NCT05634369, NCT05887882 – устойчивое подавление реакции NK-клеток на TGF- $\beta$  эпигенетическими (культуральными) методами.

Другая цель иммунотерапии – снижение иммуносупрессии ТМЕ за счет регуляции арилуглеводородного рецептора (AHR). AHR – это транскрипционный фактор, активируемый лигандом, который влияет на различные биологические функции, включая клеточную дифференцировку, злокачественную трансформацию, метаболизм и иммунную регуляцию. Антагонизм AHR повышает восприимчивость опухолевых клеток к цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, и усиливает ADCC [46]. Также было показано, что активация AHR агонистами не влияет на индуцированную пролиферацию или продукцию цитокинов, но значительно подавляет литическую функцию NK-клеток. Проводятся два клинических испытания NCT04069026 и NCT04200963,

направленных на подавление экспрессии этого рецептора. Исследование по определению дозы ингибитора AhR проходит у пациентов с распространенными формами рака, метастатическими солидными опухолями и уротелиальной карциномой. Предполагается, что множественные цели NKCE в одной молекуле автоматически должны повышать «адресность» терапии белками-«усилителями» и снижать ингибирующее действие иммуносупрессирующих факторов, что в свою очередь будет уменьшать побочные эффекты.

#### **CAR-NK-клетки**

Взаимодействие NK-клеток с клетками злокачественных новообразований усиливают, создавая CAR-NK – модифицированные естественные киллеры, экспонирующие на поверхности белки с системой «самонаведения». Для неоплазий крови в состав CAR-клеток вводят элементы для взаимодействия с трансформированными лимфоцитами, экспрессирующими CD20, CD30, CD33, что обычно не применимо для солидных опухолей [31]. Эффект иммунотерапии CAR-NK зависит от эффективной миграции этих клеток к опухоли. Свежевыделенные NK-клетки, которые никогда не подвергались воздействию цитокинов, NK, активированные в течение ночи, менее чувствительны к индукции миграции некоторыми факторами, например семейства SDF. SDF-1 $\alpha$  необходим для рекрутирования CXCR4-экспрессирующих NK-клеток. EGFRvIII-специфические CAR-NK-клетки сравнили с аналогичными клетками CAR-NK, которые были сконструированы с доменом хемокинового рецептора CXCR4 [27]. Включение CXCR4 привело к специфическому хемотаксису к клеткам, экспрессирующим CXCL12/SDF1 $\alpha$ , и, как следствие, значительному увеличению выживаемости и длительной ремиссии у мышей с опухолевыми ксенотрансплантатами по сравнению с клетками CAR-NK без экспрессии CXCR4.

Иммунотерапия CAR-NK зависит от эффективной миграции этих клеток к опухоли, однако разработка генно-инженерных технологий целевой миграции пока находится в стадии доклинических испытаний, в том числе комбинированная терапия с использованием хемокинов, например CX3CL1 [11].

#### **Таксис и инфильтрация NK-клетками опухолевой ткани с помощью наночастиц**

Доставка в строму опухоли разнообразных частиц с поверхностным белковым или магнитным якорем – альтернативный подход к использованию стимулирующей активности иммунных агонистов без системной токсичности. Клинические испытания (NCT04751786) проходит PRECIOUS-01 – терапевтическое средство на основе синтезированных наночастиц полимолочной кислоты (PLGA). Эти наночастицы со-

четают два действующих вещества: активатор iNKT-клеток – IMM60 (треитолцерамид-6) и антиген к белку NY-ESO-1. PLGA биоразлагаемый полимер с минимальной системной токсичностью, одобренный FDA в США, для *in vivo* переноса лекарств [29]. Белок NY-ESO-1 – антиген рака яичка NY-ESO-1 также обнаруживается при ряде онкологических заболеваний. Наиболее часто экспрессирующими этот маркер опухолями являются липосаркома (89-100%), нейробластома (82%), синовиальная саркома (80%), меланома (46%), рак яичников (43%), опухоли молочной железы (46%) [40]. Поскольку в норме этот белок представлен в сердце, плаценте и яичках, такие факторы, как минимальная концентрация лекарства и его адресная доставка к ткани злокачественной опухоли, что можно сделать при использовании наночастиц, будут определять успех терапии и минимизацию побочных эффектов.

Другой из разрабатываемых технологий с искусственными наночастицами является применение внешнего магнитного поля, обеспечивающего таксис NK-клеток с магнитным якорем к опухолевой ткани [15]. Например, флуорофор  $\text{Cu}_5.5$ , конъюгированный с магнетитом с кремнеземным покрытием ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ), в качестве магнитного якоря загружают в NK-клетки [33]. Внешнее магнитное поле создает возможность управлять движением клеток, содержащих наночастицы железа, а флуорофор визуализирует их миграцию. Исследователи показали, что инфильтрация стромы и противоопухолевая цитотоксичность меченных наночастицами NK-клеток увеличилась в 17 раз.

#### **Экзосомы как инструмент для биотерапии**

Наночастицы, полученные из NK-клеток – экзосомы, могут использоваться для доставки терапевтических веществ в опухолевую ткань [35]. Эти секретлируемые клетками наноразмерные везикулы, которые переносят белки, липиды и нуклеиновые кислоты, в частности регуляторные микро-РНК, действуют как медиаторы в передаче сигналов между клетками [3]. Экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию между NK и клетками опухоли [28]. Физиологические изменения, включая гипоксию, ацидоз, провоспалительные механизмы, связанные с микроокружением опухоли, могут увеличивать скорость секреции экзосом. В различных доклинических исследованиях они использовались для доставки биологических таргетных и диагностических агентов [47]. В исследовании, когда IL-15 был включен в экзосомы, выделенные из клеток линии NK-92, наблюдался более сильный противоопухолевый эффект у мышей, несущих ксено-трансплантированные клетки глиобластомы, чем у экзосом и свободного IL-15 [48].

Экзосомы, происходящие из злокачественных клеток (TDE), влияют на активность NK-клеток. Иммунные клетки чувствительны к ре-

гуляторным эффектам, опосредованным TDE, и играют значительную роль в прогрессировании заболевания [13]. Экзосомы, полученные как из NK-клеток (NK-Exos), так и из злокачественных клеток (TDE), содержат высокие концентрации регуляторных молекул. NK-Exos включают CD16, CD69, NKp44, NKG2D, DNAM1, цитотоксические перфорин, гранулизин и гранзимы A и B [16]. Кроме того, NK-Exos индуцируют апоптоз раковых клеток, активируя каскад каспаз, взаимодействуя с рецепторами Fas/Fas-L [47]. В противовес этому TDE производят широкий ряд факторов, позволяющий им защищать опухоль, снижать активность NK-клеток и подготавливать метастатические ниши. Как потенциальные цели для анти-TDE-терапии изучаются Rab27a/b, EGFR, HMGB1, интегрин, HIF1a и другие мишени [19, 25]. Показано, что экзосомальные интегрин  $\alpha_6\beta_4$  и  $\alpha_6\beta_1$  способствуют метастазированию в легкие,  $\alpha_6\beta_5$  связан с метастазированием в печень [12]. Эти интегрин рассматриваются не только как цель для блокировки, но и как маркер образования предметастатической ниши, и вызывают особый интерес исследователей при заболеваниях с высокими показателями метастазирования. Отсутствие блокады TDE позволяет опухоли подготавливать ниши иммуносупрессии для развития метастазов. Поэтому так важно соотношение между активностью и количеством NK-клеток, поддерживающих их терапевтических средств и агрессивностью и распространением самой опухоли.

Результаты различных клинических испытаний наночастиц показывают, что они позволяют эффективно снизить концентрацию терапевтического агента, биоразлагаемые частицы практически не оказывают системной токсичности, из-за малых размеров они легче проникают в строму опухоли, чем сами NK-клетки. Эти свойства позволяют наночастицам поддерживать терапию NK-клетками и инженерными антителами.

## **Заключение**

Успех NK-клеточной иммунотерапии при лечении гемобластозов поддерживает интерес к поиску и разработке новых вариантов инженерных молекул, увеличивающих возможности этих клеток уничтожать или как минимум сдерживать рост солидных опухолей. Предположения о том, что множественные цели НКСЕ в одной молекуле будут повышать «адресность» терапии рекомбинантными белками, инициировали ряд клинических и доклинических исследований. Повышение специфичности терапии также достигается за счет использования антител нового поколения – наноантител, целевой блокировки TDE, а также доменов белков, усиливающих направленную миграцию NK-клеток, и терапевтических наночастиц.

## Список литературы / References

1. André P., Denis C., Soulas C., Bourbon-Caillet C., Lopez J., Arnoux T., Bléry M., Bonnafous C., Gauthier L., Morel A., Rossi B., Remark R., Bresó V., Bonnet E., Habif G., Guia S., Lalanne A.I., Hoffmann C., Lantz O., Fayette J., Boyer-Chammard A., Zerbib R., Dodion P., Ghadially H., Jure-Kunkel M., Morel Y., Herbst R., Narni-Mancinelli E., Cohen R.B., Vivier E. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell*, 2018, Vol. 175, no. 7, pp. 1731-1743.e13.
2. Bachanova V., Cooley S., Defor T.E., Verneris M.R., Zhang B., McKenna D.H., Curtsinger J., Panoskaltis-Mortari A., Lewis D., Hippen K., McGlave P., Weisdorf D.J., Blazar B.R., Miller J.S. Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood*, 2014, Vol. 123, no. 25, pp. 3855-3863.
3. Batista I.A., Quintas S.T., Melo S.A. The interplay of exosomes and NK Cells in Cancer Biology. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, 473. doi: 10.3390/cancers13030473.
4. Becker P.S., Suck G., Nowakowska P., Ullrich E., Seifried E., Bader P., Tonn T., Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 4, pp. 477-484.
5. Bogdan C., Vodovotz Y., Letterio J. TGF $\beta$  and IL-10: inhibitory cytokines regulating immunity and the response to infection. In: Higgs G.A., Henderson B. (eds). *Novel Cytokine Inhibitors. Progress in Inflammation Research*. Birkhäuser, Basel, 2000, pp. 217-242.
6. Bremnes R.M., Al-Shibli K., Donnem T., Sirera R., Al-Saad S., Andersen S., Stenvold H., Camps C., Busund L.T. The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2011, Vol. 6, no. 4, pp. 824-833.
7. de Mingo Pulido Á., Hänggi K., Celiás D.P., Gardner A., Li J., Batista-Bittencourt B., Mohamed E., Trillo-Tinoco J., Osunmakinde O., Peña R., Onimus A., Kaisho T., Kaufmann J., McEachern K., Soliman H., Luca V.C., Rodriguez P.C., Yu X., Ruffell B. The inhibitory receptor TIM-3 limits activation of the cGAS-STING pathway in intratumoral dendritic cells by suppressing extracellular DNA uptake. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 6, pp. 1154-1167.e7.
8. Hangasky J.A., Chen W., Dubois S.P., Daenthansanmak A., Müller J.R., Reid R., Waldmann T.A., Santi D.V. A very long-acting IL-15: implications for the immunotherapy of cancer. *J. Immunother. Cancer*, 2022, Vol. 10, no. 1, e004104. doi: 10.1136/jitc-2021-004104.
9. Harwardt J., Carrara S.C., Bogen J.P., Schoenfeld K., Grzeschik J., Hock B., Kolmar H. Generation of a symmetrical trispesific NK cell engager based on a two-in-one antibody. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1170042. doi: 10.3389/fimmu.2023.1170042.
10. Hawke L.G., Mitchell B.Z., Ormiston M.L. TGF- $\beta$  and IL-15 Synergize through MAPK pathways to drive the conversion of human NK cells to an innate lymphoid Cell 1-like phenotype. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 204, no. 12, pp. 3171-3181.
11. Hertwig L., Hamann I., Romero-Suarez S., Millward J.M., Pietrek R., Chanvillard C., Stuis H., Pollok K., Ransohoff R.M., Cardona A.E., Infante-Duarte C. CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, pp. 1984-1996.
12. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Sopló N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Labori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 2015, Vol. 527, no. 7578, pp. 329-335.
13. Hosseini R., Sarvnaz H., Arabpour M., Ramshe S.M., Asef-Kabiri L., Yousefi H., Akbari M.E., Eskandari N. Cancer exosomes and natural killer cells dysfunction: biological roles, clinical significance and implications for immunotherapy. *Mol. Cancer*, 2022, Vol. 21, no. 1, 15. doi: 10.1186/s12943-021-01492-7.
14. Indik Z.K., Park J.G., Hunter S., Schreiber A.D. Structure/function relationships of Fc gamma receptors in phagocytosis. *Semin. Immunol.*, 1995, Vol. 7, no. 1, pp. 45-54.
15. Jang E.S., Shin J.H., Ren G., Park M.J., Cheng K., Chen X., Wu J.C., Sunwoo J.B., Cheng Z. The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 2012, Vol. 33, no. 22, pp. 5584-5592.
16. Jong A.Y., Wu C.H., Li J., Sun J., Fabbri M., Wayne A.S., Seeger R.C. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *J. Extracell. Vesicles*, 2017 Vol. 6, 1294368. doi: 10.1080/20013078.2017.1294368.
17. Koehl U., Brehm C., Huenecke S., Zimmermann S.Y., Kloess S., Bremm M., Ullrich E., Soerensen J., Quaiser A., Erben S., Wunram C., Gardlowski T., Auth E., Tonn T., Seidl C., Meyer-Monard S., Stern M., Passweg J., Klingebiel T., Bader P., Schwabe D., Esser R. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front. Oncol.*, 2013, Vol. 17, no. 3, 118. doi: 10.3389/fonc.2013.00118.
18. Li Q., Ye L.J., Ren H.L., Huyan T., Li J., Shi J.L., Huang Q.S. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 7, pp. 876-888.

19. Li Y., Chen Z.K., Duan X., Zhang H.J., Xiao B.L., Wang K.M., Chen G. Targeted inhibition of tumor-derived exosomes as a novel therapeutic option for cancer. *Exp. Mol. Med.*, 2022, Vol. 54, no. 9, pp. 1379-1389.
20. Liu B., Kong L., Han K., Hong H., Marcus W.D., Chen X., Jeng E.K., Alter S., Zhu X., Rubinstein M.P., Shi S., Rhode P.R., Cai W., Wong H.C. A Novel Fusion of ALT-803 (Interleukin (IL)-15 Superagonist) with an Antibody Demonstrates Antigen-specific Antitumor Responses. *J. Biol. Chem.*, 2016, Vol. 291, no. 46, pp. 23869-23881.
21. Lizana-Vasquez G.D., Torres-Lugo M., Dixon R.B., Powderly J.D. 2nd, Warin R.F. The application of autologous cancer immunotherapies in the age of memory-NK cells. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1167666. doi: 10.3389/fimmu.2023.1167666.
22. Machuldova A., Holubova M., Caputo V.S., Cedikova M., Jindra P., Houdova L., Pitule P. Role of polymorphisms of NKG2D receptor and its ligands in acute myeloid leukemia and human stem cell transplantation. *Front Immunol*, 2021, Vol. 30, no. 12, 651751. doi: 10.3389/fimmu.2021.651751.
23. Mahdavi Firouzabadi B., Gigliobianco M.R., Joseph J.M., Censi R., Di Martino P. Design of nanoparticles in cancer therapy based on tumor microenvironment properties. *Pharmaceutics*, 2022, Vol. 14, no. 12, 2708. doi: 10.3390/pharmaceutics14122708.
24. Miller D., Egan J.O., Jeng E.K., Rock A., Wong H.C., Fehniger T.A., Miller J.S. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood*, 2018, Vol. 13, no. 23, pp. 2515-2527.
25. Morrissey S.M., Zhang F., Ding C., Montoya-Durango D.E., Hu X., Yang C., Wang Z., Yuan F., Fox M., Zhang H.G., Guo H., Tieri D., Kong M., Watson C.T., Mitchell R.A., Zhang X., McMasters K.M., Huang J., Yan J. Tumor-derived exosomes drive immunosuppressive macrophages in a pre-metastatic niche through glycolytic dominant metabolic reprogramming. *Cell Metab.*, 2021, Vol. 3, no. 10, pp. 2040-2058.e10.
26. Morton L.T., Wachsmann T.L.A., Meeuwse M.H., Wouters A.K., Remst D.F.G., van Loenen M.M., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M. T cell receptor engineering of primary NK cells to therapeutically target tumors and tumor immune evasion. *J. Immunother. Cancer*, 2022, Vol. 10, no. 3, e003715. doi: 10.1136/jitc-2021-003715.
27. Müller N., Michen S., Tietze S., Töpfer K., Schulte A., Lamszus K., Schmitz M., Schackert G., Pastan I., Temme A. Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1 $\alpha$ -secreting glioblastoma. *J. Immunother.*, 2015, Vol. 38, no. 5, pp. 197-210.
28. Myers J.A., Miller J.S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 85-100.
29. Nimesh S. 15 – Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-based nanoparticles. In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Gene Therapy, Woodhead Publishing, 2013, pp. 309-329.
30. Oka N., Markova T., Tsuzuki K., Li W., El-Darawish Y., Pencheva-Demireva M., Yamanishi K., Yamanishi H., Sakagami M., Tanaka Y., Okamura H. IL-12 regulates the expansion, phenotype, and function of murine NK cells activated by IL-15 and IL-18. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 69, no. 9, pp. 1699-1712.
31. Raponi S., De Propriis M.S., Intoppa S., Milani M.L., Vitale A., Elia L., Perbellini O., Pizzolo G., Foá R., Guarini A. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk. Lymphoma*, 2011, Vol. 52, no. 6, pp. 1098-107.
32. Raulet D.H., Gasser S., Gowen B.G., Deng W., Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 413-441.
33. Savitsky K., Yu X. Combined strategies for tumor immunotherapy with nanoparticles. *Clin. Transl. Oncol.*, 2019, Vol. 21, no. 11, pp. 1441-1449.
34. Saxena A., Wu D. Advances in Therapeutic Fc Engineering – modulation of IgG-associated effector functions and serum half-life. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 580. doi: 10.3389/fimmu.2016.00580.
35. Shen M., Ren X. New insights into the biological impacts of immune cell-derived exosomes within the tumor environment. *Cancer Lett.*, 2018, Vol. 431, pp. 115-122. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.040.
36. Sivakumar P.V., Garcia R., Waggie K.S., Anderson-Haley M., Nelson A., Hughes S.D. Comparison of vascular leak syndrome in mice treated with IL21 or IL2. *Comp. Med.*, 2013, Vol. 63, no. 1, pp. 13-21.
37. Suntharalingam G., Perry M.R., Ward S., Brett S.J., Castello-Cortes A., Brunner M.D., Panoskaltsis N. Cytokine storm in a Phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, no. 10, pp. 1018-1028.
38. Szyska M., Na I.K. Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 30, no. 7, 118. doi: 10.3389/fimmu.2016.00118.
39. Thomas B.J., Kan-O K., Loveland K.L., Elias J.A., Bardin P.G. In the shadow of fibrosis: innate immune suppression mediated by transforming growth factor- $\beta$ . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, Vol. 55, no. 6, pp. 759-766.
40. Thomas R., Al-Khadairi G., Roelands J., Hendrickx W., Dermime S., Bedognetti D., Decock J. NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: current perspectives. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 947. doi: 10.3389/fimmu.2018.00947.
41. Viel S., Marçais A., Guimaraes F.S., Loftus R., Rabilloud J., Grau M., Degouve S., Djebali S., Sanlaville A., Charrier E., Bienvenu J., Marie J.C., Caux C., Marvel J., Town L., Huntington N.D., Bartholin L., Finlay D., Smyth M.J., Walzer T. TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.*, 2016, Vol. 9, no. 415, ra19. doi: 10.1126/scisignal.aad1884.

42. von Lilienfeld-Toal M., Frank S., Leyendecker C., Feyler S., Jarmin S., Morgan R., Glasmacher A., Märten A., Schmidt-Wolf I.G., Brossart P., Cook G. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, Vol. 59, no. 6, pp. 829-839. doi: 10.1007/s00262-009-0807-3.

43. Wu J., Fu J., Zhang M., Liu D. AFM13: a first-in-class tetravalent bispecific anti-CD30/CD16A antibody for NK cell-mediated immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2015, Vol. 8, 96. doi: 10.1186/s13045-015-0188-3.

44. Wu S., Sun R., Tan B., Chen B., Zhou W., Gao D.S., Zhong J., Huang H., Jiang J., Lu B. The half-life-extended IL21 can be combined with multiple checkpoint inhibitors for tumor immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 779865. doi: 10.3389/fcell.2021.779865.

45. Wu Y., Jiang S., Ying T. Single-domain antibodies as therapeutics against human viral diseases. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1802. doi: 10.3389/fimmu.2017.01802.

46. Xue P., Fu J., Zhou Y. The aryl hydrocarbon receptor and tumor immunity. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 286. doi: 10.3389/fimmu.2018.00286.

47. Zhu L., Kalimuthu S., Gangadaran P., Oh J.M., Lee H.W., Baek S.H., Jeong S.Y., Lee S.W., Lee J., Ahn B.C. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 2732-2745.

48. Zhu L., Kalimuthu S., Oh J.M., Gangadaran P., Baek S.H., Jeong S.Y., Lee S.W., Lee J., Ahn B.C. Enhancement of antitumor potency of extracellular vesicles derived from natural killer cells by IL-15 priming. *Biomaterials*, 2019, Vol. 190-191, pp. 38-50.

---

**Авторы:**

**Воробьева И.Г.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии компании ООО «Текон МП», Москва, Россия

**Абакушина Е.В.** — д.м.н., руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии компании, заместитель генерального директора ООО «Текон МП»; заведующая лабораторией иммунологии и аутоиммунных заболеваний отдела молекулярной онкологии и иммунологии ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

---

**Authors:**

**Vorobyova I.G.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department for Development and Research in the Field of Immunology, LLC "Tecon MP", Moscow, Russian Federation

**Abakushina E.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department for Development and Research in the Field of Immunology, Deputy General Director, LLC "Tecon MP"; Head, Laboratory of Immunology and Autoimmune Diseases, Department of Molecular Oncology and Immunology, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 29.11.2023  
Принята к печати 09.03.2024

---

Received 29.11.2023  
Accepted 09.03.2024