

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕК 293Т В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРА ПРОЛИФЕРАЦИИ НК-КЛЕТОК В КОНТЕКСТЕ РАЗРАБОТКИ CAR-НК-ТЕРАПИИ

Федорова П. О.^{1, 2, 3},

Чикилева И. О.³,

Киселевский М. В.³

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

² ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова.

³ Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

CAR-NK THERAPY: NK CELL EXPANSION EXPOSED TO HEK 293T CELL LINE

Fedorova P. O. ^{a, b, c},

Chikileva I. O. ^c,

Kiselevskiy M. V. ^c

^a Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University).

^b Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Vaccines and Serums them. I.I. Mechnikov").

^c Research Institute of Experimental Therapy and Diagnostics of Tumor, NN Blokhin National Medical Center of Oncology.

Резюме

На сегодняшний день для лечения онкологических заболеваний активно разрабатываются клеточные продукты на основе лимфоцитов, экспрессирующих химерный рецептор антигена (CAR). Так как для инфузии пациенту требуется большое количество CAR-лимфоцитов, при их получении обязательно проводится этап обогащения данных иммунных клеток. Наиболее часто в методиках для эффективной экспансии НК-клеток применяют аллогенные фидерные клетки, при контакте с которыми иммунные клетки вступают в пролиферацию. Наиболее часто в исследовательских целях различных направлений используется клеточная линия почек эмбриона человека, содержащая Т-антиген SV40 (НЕК 293Т), поскольку она с легкостью поддается генетическим модификациям. Высокая эффективность проводимой трансдукции указывает на потенциальную возможность модификации клеток НЕК 293Т с целью экспрессии опухолевых антигенов или провоспалительных цитокинов, что может быть использовано для активации и обогащения НК-клеток. В данной работе проводилась оценка воздействия немодифицированной культуры клеток НЕК 293Т на цитотоксичность и экспрессию активационных маркеров НК- и НКТ-клеток в режиме длительного культивирования в присутствии необлученных аутологичных фидерных клеток. В исследовании использовали мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров-добровольцев. Стимуляцию пролиферации проводили с помощью антител к CD3 и CD28-рецепторам или обработанной митомицином С культуры клеток НЕК 293Т. Проллиферацию клеток оценивали путем прямого подсчета их количества в присутствии красителя трипанового синего. Цитотоксичность определяли на культурах-мишенях HG3, T47D-HER2+, K562. Для анализа экспрессии поверхностных рецепторов проводили проточную цитометрию с помощью меченых моноклональных антител. Было предложено четыре различных способа активации лимфоцитов с помощью НЕК 293Т. Мы обнаружили, что при

использовании клеточной линии HEK 293T при всех режимах активации наблюдалось увеличение доли CD3-CD56+клеток в популяции, а также повышенная экспрессия активационных маркеров НК-клеток – NKp30 и NKG2D, кроме того, возрастала доля CD16+ и CD3+CD4+лимфоцитов клеток относительно активации только моноклональными антителами. Из предложенных вариантов соинкубации лимфоцитов с фидерными клетками HEK 293T наиболее эффективное обогащение НК-клеток было описано для протокола, предусматривающего использование клеточной линии HEK 293T однократно перед началом инкубации без дополнительной стимуляции пролиферации с помощью моноклональных антител. Такой вариант приводил к увеличению доли CD56+лимфоцитов до 60% уже на 4-й день культивирования. Таким образом, клетки линии HEK 293T стимулируют деление НК-клеток, следовательно, могут быть использованы в качестве фидерных клеток при разработке CAR-НК-клеточного продукта. Поскольку HEK 293T легко поддается генетическим модификациям, то в дальнейшем возможно создание модифицированной культуры HEK 293T, способной обогащать популяцию НК-клеток с большей эффективностью.

Ключевые слова: CAR-терапия, CAR-НК-терапия, обогащение НК-клеток, моноклональные антитела, аллогенные фидерные клетки, HEK 293T.

Abstract

While creating chimeric antigen receptor (CAR) NK cells, it is necessary to conduct a stage of these immune cell enrichment. Feeder cells are most often used in methods for the effective NK cell expansion. The human embryonic kidney cell line containing the SV40 T-antigen (HEK 293T) is most often used for research purposes in various areas, since it is easily subjected to genetic modifications. This property indicates the potential for modifying HEK 293T cells to express tumor antigens or proinflammatory cytokines, which can be used to activate and enrich NK cells. In this work, we assessed the effect of unmodified HEK 293T cell culture on cytotoxicity and expression of NK and NKT cell activation markers in long-term cultivation in the presence of non-irradiated autologous feeder cells. The study used peripheral blood mononuclear cells collected from healthy volunteer donors. Proliferation was stimulated using antibodies against CD3 and CD28 receptors or mitomycin C-treated HEK 293T cell culture. Cell proliferation was assessed by direct cell counting added with trypan blue dye. Cytotoxicity was determined on HG3, T47D-HER2+, K562 target cultures. Flow cytometry with labeled monoclonal antibodies was used to analyze the expression of surface receptors. Four different methods for lymphocyte activation using HEK 293T were proposed. We found that when using the HEK 293T cell line, an increased percentage of CD3-CD56+ cells in the population was observed in all activation modes, as well as increased expression of NK cell activation markers - NKp30 and NKG2D, in addition, the proportion of CD16+ and CD3+CD4+ lymphocytes increased relative to activation with monoclonal antibodies alone. Of the proposed options for coincubation of lymphocytes with HEK 293T feeder cells, the most effective NK cells expansion was described for the protocol involving the use of the HEK 293T cell line once before the onset of incubation without proliferation additionally stimulated with monoclonal antibodies. This approach resulted in higher proportion of CD56+ lymphocytes reaching to 60% as early as on day 4 of cultivation. Thus, HEK 293T

cells stimulate NK cells division, therefore, they can be used as feeder cells in a CAR NK cell product development.

Keywords: CAR therapy, CAR NK therapy, expansion of NK cells, monoclonal antibodies, allogeneic feeder cells, HEK 293T.

1 Введение

Создание персонализированного препарата для иммунотерапии опухолевых заболеваний, включающей генетическую модификацию иммунных клеток, состоит из нескольких этапов. В первую очередь, это выбор популяции иммунных клеток, которая будет осуществлять противоопухолевую активность, а также разработка генетической конструкции химерного рецептора антигена (CAR), экспрессия которого необходима для эффективного распознавания опухолевых антигенов и последующей активации иммунной клетки. На данный момент в большинстве доклинических и клинических испытаний используются Т-лимфоциты ввиду их активного клеточного деления и выраженного цитотоксического действия. Кроме того, Т-клетки легко получить от донора или пациента в большом количестве, например, при заборе крови [1]. Однако, данная клеточная популяция не лишена недостатков при ее использовании в рамках CAR-терапии. При инфузии CAR-Т-клеток у пациентов наблюдается развитие нежелательных побочных реакций различной степени тяжести, чаще всего пациенты сталкиваются с синдромом высвобождения цитокинов и нейротоксичностью [2]. Кроме того, такая терапия требует тщательного подбора донора по системе главного лейкоцитарного антигена человека (HLA), что может быть осложнено отсутствием у пациента кровных родственников, а также увеличивает сроки изготовления CAR-Т-препарата [3]. Альтернативой Т-лимфоцитам могут служить натуральные киллеры (НК). Их использование не требует детального подбора донора, а при инфузии данных клеток не наблюдается выраженных токсических проявлений [4]. CAR-терапия на основе НКТ-клеток, обладающих как характеристиками НК-, так и характеристиками Т-клеток, также является заслуживающим внимания подходом к лечению опухолевых заболеваний. НКТ-клетки являются одними из главных участников реализации противоопухолевой иммунной защиты, а также выделяют широкий спектр провоспалительных цитокинов [5].

Следующими этапами разработки CAR-препарата после выбора популяции иммунных клеток является их выделение из источника клеток, активация, генетическая модификация, обогащение CAR-лимфоцитов, а также заморозка готового клеточного продукта на финальном этапе культивирования. Существуют различные протоколы для экспансии клеток-эффекторов, в которых варьируют такие характеристики, как длительность культивирования, тип клеточной популяции, источник иммунных клеток, использование методов сепарации, способ внедрения в клетку генетической конструкции, использование активаторов пролиферации и наличие в питательной среде фидерных клеток.

В большинстве методик для обогащения популяции НК-клеток используется длительный режим культивирования в течение 21 дня. В качестве источников НК-клеток используются моноклеарные клетки периферической крови (МНК), пуповинная кровь, стволовые клетки и линии НК-клеток [6]. Для генетической модификации НК-клеток используются те же инструменты, что и для манипуляций с Т-лимфоцитами: CAR-трансген доставляется в НК-клетки с помощью вирусных и невирусных векторов [7]. Также для получения «чистой» популяции НК-клеток используются методы разделения клеточных популяций с применением клеточного сортера или магнитного сепаратора. Несмотря на различия между НК- и НКТ-клетками, протоколы для экспансии НКТ-клеток мало отличаются от таковых для НК-клеток, они также включают длительный режим культивирования и наличие активаторов пролиферации [8].

Ex vivo активация и стимуляция пролиферации выделенных НК- или НКТ-клеток необходима по нескольким причинам. Так степень активации иммунных клеток коррелирует с эффективностью проводимых генетических модификаций, поскольку процесс клеточного деления облегчает проникновение в клетку вирусного вектора [9]. Экспансия НК- и НКТ-клеток *ex vivo* является важной задачей при создании CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток,

поскольку для иммунотерапии требуется введение большого количества модифицированных лимфоцитов. Кроме того, активированные иммунные клетки обладают естественной повышенной цитотоксичностью, что лежит в основе другого подхода к иммунотерапии опухолевых заболеваний – адоптивной клеточной терапии с использованием активированных опухоле-инфильтрирующих лимфоцитов [10].

Существует три подхода к стимуляции НК- и НКТ-клеток: использование провоспалительных цитокинов, фидерных клеток и/или веществ, активирующих рецепторы врожденного или приобретенного иммунитета (L-фитогемагглютинин, конканавалин А, MICA, липополисахарид, иономицин, моноклональные антитела (МАТ) к CD3- и CD28-рецепторам). Согласно литературным данным, наиболее часто в методиках для эффективной экспансии НК-клеток применяют фидерные клетки, которые подразделяются на аутологичные и аллогенные. В качестве аутологичных фидерных клеток рассматривается сокультивирование с целевой популяцией других иммунных клеток, полученных из того же источника и оказывающих активирующее воздействие путем межклеточного контакта или через секрецию цитокинов. [11]. Использование аутологичных фидерных клеток является хорошо изученной, безопасной и максимально приближенной к *in vivo* условиям технологией. Тем не менее, при использовании необлученных фидерных клеток такой подход может приводить к их нежелательной экспансии и «загрязнению» клеточного продукта.

Помимо рассмотренных аутологичных фидерных клеток, в качестве аллогенных фидеров выступают различные клеточные линии. Среди них наиболее распространенными для активации НК-клеток являются: В-клеточная лимфобластома, трансформированная вирусом Эпштейна-Барр (EBV-TM-LCL), хроническая миелогенная лейкемия (K562) с различными

генетическими модификациями, промиелоцитарная лейкемия (U937), Т-лимфобластная лейкемия (СЕМ), а также Т-лимфобластная лейкемия (Jurkat) [12-14]. Также для усиления стимуляции НК-клеток используют клеточные культуры, модифицированные таким образом, что клетки данных линий экспрессируют интерлейкины или другие активационные молекулы [15-16].

Клеточная линия почек эмбриона человека, содержащая Т-антиген SV40 (НЕК 293Т) является одной из самых часто используемых клеточных культур в лабораторной практике. Благодаря белку SV40 клетки НЕК 293Т обладают способностью реплицировать векторы, несущие область репликации SV40, что находит широкое применение для производства ретровирусов, экспрессии генов и производства белков [17-19]. Высокая эффективность проводимой трансдукции указывает на потенциальную возможность модификации клеток НЕК 293Т с целью экспрессии опухолевых антигенов или провоспалительных цитокинов, что может быть использовано для активации и обогащения НК-клеток. В данной работе проводилась оценка воздействия немодифицированной культуры клеток НЕК 293Т на пролиферацию, цитотоксичность и экспрессию активационных маркеров НК- и НКТ-клеток в режиме длительного культивирования в присутствии необлученных аутологичных фидерных клеток.

2 Материалы и методы

Выделение моноклеарных клеток (МНК) из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата

Выделение МНК из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата проводили с использованием метода седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла ($\rho=1,077$ г/см³). Кровь из пробирок, содержащих ЭДТА, разводили в два раза раствором Хенкса (ПанЭко, Россия). При выделении клеток из лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата его центрифугировали 10 минут при 1500 g,

+23°C, отбирали лейкоцитарный слой и разводили его раствором Хенкса в три раза. Далее, вне зависимости от источника МНК, образцы наслаивали на 1,5 мл фиколла (FICOLL RAQUE, GE HEALTHCARE, США) и центрифугировали 25 мин при 1500 g, +23°C. Затем отбирали слой моноклеарных клеток и проводили трехкратную отмывку раствором Хенкса, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g, +23°C и отбирая после этого надосадочную жидкость. После этого проводили подсчет живых клеток с использованием красителя трипанового синего (ПанЭко, Россия) в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Показатель жизнеспособности >90% считали удовлетворительным. Клетки доводили до рабочей концентрации 3,5-4*10⁶/мл с помощью питательной среды ДМЕМ, содержащей 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), а также 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия). После этого свежевыделенные МНК подвергали активации.

Сорбция моноклональных антител для последующей активации МНК

Для активации МНК использовали МАТ к CD3- и CD28-рецепторам (BioLegend, США) в концентрациях 5 мкг/мл для анти-CD3 антител и 10 мкг/мл анти-CD28 антител. Для достижения заданной концентрации антител готовили их растворы в стерильном фосфатном буферном солевом растворе (ФСБ) и добавляли по 1 мл/лунку в стерильный 12-ти луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея). Далее проводили инкубацию в течение 5 ч и последующую трехкратную отмывку от не связавшихся антител с помощью 1%-раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Roedermark, Germany) в ФСБ.

Активация свежевыделенных МНК

В данной работе активацию свежевыделенных МНК проводили двумя способами: с помощью МАТ и с помощью фидерных клеток клеточной линии

почек эмбриона человека HEK 293T полученной из коллекции клеточных культур НМИЦ Онкологии им. Н. Н. Блохина. При активации МАТ суспензию МНК вносили к сорбированным антителам в концентрации $3,5-4 \cdot 10^6$ /мл. После чего клетки инкубировали 48 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе модели SCO5A (Sheldon Manufacturing Inc, США). При активации свежевыделенных МНК эмбриональными клетками HEK 293T $3,5-4 \cdot 10^6$ /мл МНК вносили в стерильный 12-ти луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея), в лунках которого находились обработанные Митомицином С (Sigma-Aldrich, США) HEK 293T в состоянии монослоя. Соотношение МНК: HEK 293T составляло 5:1. Далее клетки инкубировали 48 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе.

Обработка HEK 293T Митомицином С

Для блокировки клеточного деления клеточную линию HEK 293T сеяли в стерильный 12-ти луночный культуральный планшет с использованием полной ростовой среды ДМЕМ, количество клеток в посевном материале составляло $4,5 \cdot 10^5$ /лунку. На следующий день, когда культура достигала 100% конфлюэнтности, из лунок осторожно удаляли весь объем культуральной среды. Далее в каждую лунку добавляли по 1 мл свежей культуральной среды, содержащей митомицин С в концентрации 7,5 мкг/мл. Инкубировали планшет 1 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе. Далее проводили двукратную отмывку раствором Хенкса, после чего добавляли по 1,5 мл/лунку свежей полной культуральной среды. Инкубировали планшет 1 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе, однократно отмывали лунки раствором Хенкса и добавляли по 2 мл/лунку свежей полной культуральной среды.

Повторная активация МНК

Дополнительную активацию первичной культуры лимфоцитов проводили на 8-й и/или 15-й день культивирования. Для этого при помощи автоматического счетчика клеток подсчитывали концентрацию и

жизнеспособность лимфоцитов. Показатель жизнеспособности >90% считали удовлетворительным. Из лунок 12-ти луночного культурального планшета, содержащего однодневную монослойную культуру HEK 293T, обработанную митомицином C, удаляли питательную среду и вносили по 2 мл/лунку первичной культуры лимфоцитов, доведенной до концентрации $1,8 \cdot 10^6$ клеток/мл в полной культуральной среде. Инкубировали 20 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Далее осторожно переносили лимфоциты в стерильный 6-ти луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея) и добавляли равный объем полной культуральной средой, содержащей 500 IU/мл человеческого рекомбинантного IL-2 (Xuri, Китай).

Культивирование лимфоцитов

Культивирование лимфоцитов проводили в течение 21 дня с момента выделения МНК. Клетки культивировали в 12-луночных и 6-луночных культуральных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея) и в культуральных флаконах 25 см² (SPL life Sciences, Республика Корея) в присутствии питательной среды ДМЕМ с 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS, 500 IU/мл человеческого рекомбинантного IL-2 (Xuri, Китай), 10 нг/мл человеческого рекомбинантного IL-15 (Sci-Store, Россия), 20 нг/мл человеческого рекомбинантного IL-21 (Peprotech, США) при 37°C в CO₂-инкубаторе. Периодически с помощью световой микроскопии производили контроль морфологических характеристик лимфоцитов и визуальный контроль отсутствия микробной контаминации. С использованием трипанового синего и автоматического счетчика клеток проводили оценку жизнеспособности и количества культивируемых клеток. Показатель жизнеспособности >90% считали удовлетворительным. Концентрацию клеток при культивировании поддерживали в диапазоне от $3 \cdot 10^5$ /мл до $1 \cdot 10^6$ /мл.

Культивирование клеточных линий

В работе использовали линии клеток HEK 293T, HG3, T47D-HER2+ и K562, полученные из коллекции клеточных культур НМИЦ Онкологии им. Н. Н. Блохина. Клеточные линии HEK 293T, HG3 и K562 культивировали на среде ДМЕМ (Панэко, Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS и пенициллин-стрептомицин (Панэко, Россия), и инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Клеточную культуру T47D-HER2+ культивировали на среде RPMI-1640 (Панэко, Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS и генетицин (Панэко, Россия), и инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C.

Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии производили анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов. На этапе пробоподготовки живые клетки подсчитывали и доводили до концентрации $1 \cdot 10^6$ /мл. К 100 мкл клеток добавляли меченые флюорохромом МАТ в концентрациях, рекомендованных производителем. Инкубировали 30 мин при 4°C в темноте. Далее производили трехкратную отмывку раствором ФСБ от несвязавшихся антител, центрифугируя 1500 g 5 мин 23°C и удаляя надосадочную жидкость. К осадку добавляли 200 мкл ФСБ и раствор пропидия йодида (PI) до конечной концентрации 30 нг/мл (Sigma, США). Изучение экспрессии поверхностных маркеров осуществляли при использовании следующих МАТ: анти-CD3-PerCP (BD Pharmingen, США), анти-CD56-PE (Life Technologies, США), анти-CD8-APC (Invitrogen, США), анти-CD4-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-PE (BD Pharmingen, США), анти-CD25-APC (BD Pharmingen, США), анти-NKp30 /CD337-PE (BD Pharmingen, США), анти-NKG2D/CD314-APC (BD Pharmingen, США), анти-CD38-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD69-PE (BD Pharmingen, США). Комбинацию меченых флуорохромами антител для обработки проб подбирали с учетом особенности диапазона

детекции длины волны каждого флуорохрома. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США) с использованием программного обеспечения Novo-Express 1.5.0. Погибшие клетки исключали из анализа по показателям рассеивания. Анализировали не менее 10 тыс. живых клеток.

Цитотоксический тест

Для оценки эффекторной функции культивируемых лимфоцитов использовали раствор резазурина в концентрации 5 мг/мл (Sigma-Aldrich, США). В качестве культур-мишеней использовали суспензионные культуры HG3 и K562, а также адгезионную культуру T47D-HER2+. Для проведения цитотоксического теста использовали стерильные 96-луночные планшеты (SPL life Sciences, Республика Корея), в которые одномоментно вносили клетки-эффекторы (Э) и клетки-мишени (М) в соотношении Э:М : 5:1. При проведении цитотоксического теста концентрация клеток HG3 или K562 составляла $1 \cdot 10^4$ клеток/лунку, а концентрация T47D-HER2+ – $0,5 \cdot 10^4$ клеток/лунку. В качестве отрицательного контроля мишеней использовали лунки, в которые вместо эффекторов вносили полную ростовую среду ДМЕМ. В качестве отрицательного контроля эффекторов использовали лунки, в которые вместо мишеней вносили полную ростовую среду ДМЕМ. Для оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в лунки дополнительно вносили анти-HER2 МАТ Герцептин (Трастузумаб) (Roche, Швейцария) в конечной концентрации 5 мкг/мл при использовании в качестве мишени клеточную линию T47D-HER2+, или анти-CD20 МАТ Ритуксимаб (Roche, Швейцария) в конечной концентрации 5 мкг/мл при использовании в качестве мишени линию HG3. Конечный объем в каждой контрольной или экспериментальной лунке составлял 220 мкл. Каждая анализируемая точка имела три повтора. Затем планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в течение суток. На следующий день в каждую лунку

вносили по 20 мкл раствора резазурина аналогично протоколу AlamarBlue Cell Viability Reagent Product Information Sheet (Pub. No. MAN0018317 C.0). Затем планшет инкубировали в течение суток в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и измеряли интенсивность флуоресценции на мультирежимном планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Анализ проводили при длине возбуждения 560 нм и длине эмиссии 600 нм с использованием программного обеспечения Sparkcontrol v3.1. Цитотоксичность (%) оценивали по формуле:

$$(1 - ((Э + М) - Э)/М) * 100, \text{ где}$$

Э+М – это среднее значение интенсивности флуоресценции для трех аналогичных лунок, в которых находились клетки-эффекторы и клетки-мишени

Э – это среднее значение интенсивности флуоресценции для трех аналогичных лунок, в которых находились только клетки-эффекторы

М – это среднее значение интенсивности флуоресценции для трех аналогичных лунок, в которых находились только клетки-мишени

Статистическая обработка данных

Данные экспериментов представлены как среднее значение $\pm$ SD. Результаты были проанализированы с использованием Statistica 10. Тест ANOVA с критерием Tukey HSD использовался для оценки различий. Достоверными считали значения $p < 0,05$.

3 Результаты

В данной работе использовались различные схемы для активации первичной культуры лимфоцитов (рис. 1). Так активация проводилась с помощью МАТ, НЕК 293Т или при сочетании обоих способов. В качестве группы сравнения использовали лимфоциты, активированные только МАТ к CD3-, CD28-рецепторам в начале культивирования, поскольку данный подход для экспансии иммунных клеток на сегодняшний день, согласно

литературным данным, является самым распространенным. Оценка эффективности используемого метода активации проводилась путем анализа популяционного состава культивируемых клеток, экспрессии активационных поверхностных маркеров а также сравнения реализации эффекторных функций в отношении адгезионной культуры T47D-HER2+, суспензионной культуры HG3 и «классической» мишени для НК-клеток – суспензионной клеточной линии K562.

Активация лимфоцитов МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т

В зависимости от выбранного режима активации выявлялись различные биологические эффекты НЕК 293Т на первичную культуру лимфоцитов. При активации МАТ с последующей дополнительной стимуляцией культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования наблюдалось увеличение доли CD3-CD56+, CD56+CD16+, CD56+CD4+, CD56+NKp30+ клеток и иммунорегуляторного индекса к 14-му дню культивирования, относительно активации только МАТ (табл. 1). Однако к 21-му дню культивирования экспрессия активационных маркеров, за исключением CD16-рецептора, снижалась, и фенотипические характеристики культивируемых лимфоцитов оказывались сопоставимы с контролем. Также в рамках исследования проводились различные цитотоксические тесты: на культуре клеток рака молочной железы, которая сверхэкспрессирует рецептор HER2 (T47D-HER2+), и клеточной линии хронической В-клеточной лейкемии (HG3) изучали антителозависимую клеточную цитотоксичность, а на культуре клеток хронической миелогенной лейкемии – прямую цитотоксичность. Цитотоксичность иммунных клеток после дополнительной стимуляции на 8-й день культивирования в отношении клеток-мишеней HG3 была выше цитотоксичности лимфоцитов, активированных только МАТ (рис. 2). Также

на 14-й день относительно контроля наблюдалось увеличение цитотоксичности при использовании культуры-мишени K562.

Применение однократной дополнительной активации лимфоцитов клеточной линией HEK 293T на 15-й день культивирования приводило к увеличению в процентном соотношении CD3-CD56+, CD56+CD4+, CD56+CD16+ и CD56+NKp30+ лимфоцитов, а также иммунорегуляторного индекса относительно активации с использованием только МАТ, но снижало цитотоксичность по отношению к суспензионной линии HG3 (табл. 2, рис. 2). По результатам цитотоксического теста, проводимого на 21-й день культивирования, при данном режиме активации наблюдался наибольший процент цитотоксичности при использовании «классической» мишени НК-клеток – K562, а цитотоксичность по отношению к адгезионной культуре T47D-HER2+ оказалось сопоставима с контролем.

Двукратная стимуляция культивируемых лимфоцитов, проводимая на 8-й и 15-й день культивирования, демонстрировала снижение цитотоксичности относительно однократных методов стимуляции и относительно активации МАТ (рис. 2). Тем не менее, данный режим активации оказывал наиболее выраженное (относительно комбинированных методов активации МАТ и клеточной линией) влияние на увеличение экспрессии CD56+CD4+, CD56+NKp30+ и CD56+CD16+ лимфоцитов, определение которой проводилось на 21-й день культивирования (табл. 3).

Активация лимфоцитов клеточной линией HEK 293T в начале культивирования

Принципиально иным подходом к активации и обогащению популяции НК-клеток являлась стимуляция неактивированных МНК клетками HEK 293T без использования МАТ. Хотя при данном способе активации отмечался наименьший прирост активированных клеток (данные не представлены), такой подход оказался самым эффективным для обогащения

популяции НК-клеток: на 4-й день после стимуляции HEK 293T доля НК-клеток (CD3-CD56+) составляла в среднем 43%, в то время как в контроле доля CD3-CD56+лимфоцитов была 14,67% (табл. 4). Данная стимулированная культура лимфоцитов имела повышенную экспрессию NKG2D, NKp30 и CD16-рецептора на поверхности CD56+клеток относительно контроля. При рассмотрении динамики экспрессии поверхностных маркеров и соотношения популяций лимфоцитов в период с 4-го по 14-й день культивирования после активации клетками HEK 293T отмечалось постепенное уменьшение доли CD3-CD56+, CD3+CD56-, CD56+CD8+клеток, а также возрастание доли CD3+CD56+, CD56+CD4+, CD56+NKp30+ и CD56+CD16+ лимфоцитов.

Результаты анализа экспрессии ранних маркеров активации (CD38, CD69, CD25), проводимого на 4-е сутки после активации HEK, показали увеличение экспрессии данных рецепторов на поверхности CD56+клеток, что указывало на воздействие опухолевой линии именно на CD56+популяцию НК-и НКТ-клеток (табл. 5). По показателям цитотоксического теста проявление эффекторной функции данной культуры по отношению к линии T47D-HER2+ было выше цитотоксичности культуры, однократно активированной МАТ (рис. 3). Результаты цитотоксических тестов, проводимых на других культурах-мишенях, оказались незначительно ниже относительно контрольной группы.

4 Обсуждение

Каждый из предложенных режимов активации первичной культуры лимфоцитов имеет свои достоинства и недостатки. Так активация с помощью МАТ и последующая дополнительная стимуляция HEK 293T на 8-й день культивирования приводила к повышению эффекторных функций и экспрессии на поверхности лимфоцитов НК-маркеров активации. Однако в динамике культивирования постепенно наблюдалось нивелирование положительных эффектов соинкубации с клеточной линией. Вероятно,

364 снижение экспрессии маркеров активации происходило ввиду длительного
365 отсутствия прямого контакта НК- и НКТ-клеток с клетками-мишенями. Одним
366 из вариантов устранения данного эффекта является сокращение срока
367 культивирования первичной культуры лимфоцитов, продолжительность
368 которого в данной серии экспериментов была выбрана исходя из
369 многочисленных протоколов для экспансии лимфоцитов, активированных
370 МАТ.

371 Другими подходами к сохранению активационного профиля
372 культивируемых лимфоцитов, продемонстрированных в данной работе,
373 является активация клеточной культурой на более поздние сроки
374 культивирования или повторная соинкубация с клетками НЕК 293Т. При
375 стимуляции деления лимфоцитов на 15-й день к концу срока культивирования
376 положительный эффект от взаимодействия с НЕК 293Т сохранялся, но
377 наблюдалось снижение эффекторных функций. Относительно способа
378 активации на 8-й день культивирования, при данном подходе выраженность
379 экспрессии активационных маркеров через неделю после соинкубации с НЕК
380 293Т была ниже. Предположительно, двухнедельная зрелая культура
381 лимфоцитов имеет весьма ограниченный потенциал деления, поэтому
382 стимуляция пролиферации на 15-й день культивирования не приводила к
383 выраженной экспансии НК-клеток и экспрессии активационных
384 поверхностных маркеров.

385 Схожие результаты наблюдались и при двукратной активации фидерами
386 первичной культуры лимфоцитов, однако в данном случае отмечалась самая
387 высокая экспрессия ряда маркеров. Вероятно, повторный контакт с клетками-
388 мишенями вызывал активацию и пролиферацию НЕК 293Т-специфичных
389 НКТ- и НК-клеток памяти, субпопуляция которых, по-видимому,
390 образовалась после первого контакта с фидерами [20]. При повторной
391 активации лимфоцитов наблюдалось существенное увеличение CD56+клеток,

экспрессирующих CD4+корцептор, что, возможно, косвенно указывает на наличие в культуре лимфоцитов НКТ-клеток памяти, экспрессирующих данную корцепторную молекулу [21].

Наиболее предпочтительным для обогащения популяции НК- и НКТ-клеток являлся режим однократной активации клеточной линией НЕК 293Т без использования МАТ. Так на 4-е сутки после активации доля CD56+лимфоцитов составляла около 60%. Низкая пролиферация первичной культуры лимфоцитов относительно клеток, активированных МАТ (данные не представлены), связана, вероятно, с ограниченным потенциалом клеточного деления у НК-клеток, а также отсутствием стимуляции клеточного деления Т-лимфоцитов, и, как следствие, более низкой, относительно активации МАТ, секреции провоспалительных цитокинов делящимися клетками. Поскольку средняя продолжительность жизни НК-клеток составляет две недели [22], культивирование первичной культуры лимфоцитов при данном режиме активации составляла не более 14 дней. В качестве улучшения эффективности метода предлагается дальнейшее сокращение срока культивирования. Хотя данный подход к экспансии НК- и НКТ-клеток приводит к незначительному абсолютному возрастанию количества данных клеток, и, возможно, имеет ограниченное применение при создании БМКП, он представляет собой необходимый задел для дальнейшего повышения эффективности протоколов по экспансии НК- и НКТ-клеток *in vitro*.

Итак, влияние линии НЕК 293Т на первичную культуру лимфоцитов имеет свои характерные черты. Это выраженное возрастание доли НК- и НКТ-клеток при отсутствии увеличения общего количества лимфоцитов, и снижение цитотоксичности культивируемых лимфоцитов относительно контроля. Предполагается, что стимуляция деления НК- и НКТ-клеток связана с прямым межклеточным взаимодействием с опухолевыми клетками, а также посредством цитокинов, продуцируемых Т-хелперами: при

некоторых режимах культивирования наблюдалось существенное возрастание доли этих клеток, а они, как известно, способны стимулировать экспансию НК-клеток [23]. Данное явление подтверждается исследованиями о том, что Т-клеточный антиген SV40, который экспрессируют клетки HEK 293T, стимулирует Т-хелперы [24].

Отсутствие повышения цитотоксичности лимфоцитов относительно контроля в ответ на стимуляцию фидерными клетками может быть объяснено специфическим выбором группы сравнения: активация МАТ приводит к выраженной пролиферации CD3+CD8+лимфоцитов, которые сами по себе обладают высокой цитотоксической активностью. Тем не менее, выбор в качестве контроля именно такого способа активации, по нашему мнению, вполне оправдан, поскольку позволяет соотносить экспериментальные результаты с актуальным и наиболее распространенным протоколом для экспансии клеток в рамках создания CAR-лимфоцитов. Также снижение цитотоксичности анализируемых лимфоцитов, вероятно, коррелирует с прямым угнетающим воздействием линии HEK 293T. Т-клеточный антиген SV40 способен ингибировать продукцию ИФН γ [25], инактивировать белок p53 [26], а также вызывать истощение Т-лимфоцитов [27]. Тем не менее, преимущество использования клеточной линии HEK 293T для стимуляции лимфоцитов заключается в простоте проведения генетических манипуляций с данной культурой [28]. Например, экспрессия опухоль-ассоциированных антигенов, связанных с мембраной цитокинов и/или иных активирующих молекул сможет улучшить антигенное распознавание, выживаемость, пролиферацию и цитотоксичность иммунных клеток [29]. Для более полной оценки потенциала культуры HEK 293T в качестве фидерных клеток также необходим сравнительный анализ данной клеточной линии с более «традиционными» стимуляторами деления НК-клеток: K562, Jurkat, EBV-TM-LCL [30].

Таким образом, роль фидерных клеток при создании эффективного БМКП на основе НК- или НКТ-клеток многогранна и на сегодняшний день является малоизученной. При использовании аутологичных фидерных клеток активация и обогащение НК-клеток происходит вследствие секреции цитокинов, а при соинкубации с опухолевыми линиями – не только за счет продукции провоспалительных агентов, но и путем прямого межклеточного контакта эффекторов и мишеней, что является наиболее приближенной моделью к взаимодействию данных клеток в условиях *in vivo*. Кроме того, использование опухолевых клеточных культур позволяют получить активированную популяцию иммунных клеток в относительно короткий срок, что является важным обстоятельством при создании БМКП [31]. Обогащение популяции НК-клеток с помощью опухолевых клеток может использоваться совместно с добавлением в питательную среду интерлейкинов, МАТ к рецепторам НК-клеток или клеточных митогенов, способствуя повышению эффективности экспансии и генетических модификаций, и, как следствие, усовершенствованию процесса производства CAR НК- и CAR НКТ-клеток [32].

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность лаборатории Клеточного иммунитета НИИ ЭДиТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина за участие в экспериментальной части работы.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Рецепторный профиль и соотношение субпопуляций лимфоцитов при дополнительной стимуляции клеточной линией HEK 293T на 8-й день культивирования, $p < 0,05$.

Table 1. Receptor profile and lymphocyte subpopulations after additional stimulation with the HEK 293T cells on the 8th cultivation day, $p < 0.05$.

День культивирования Cultivation day	1-й (до активации) 1st (before activation)	7-й 7th	14-й 14th	21-й 21st
Активация МАТ однократно в начале культивирования Activation with mAbs at the beginning of cultivation				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	18,15 ± 2,5	9,34 ± 1,1	6,89 ± 0,8	3,62 ± 0,5
Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	5,5 ± 0,9	16,52 ± 1,7	39,03 ± 4,2	73,52 ± 7,5
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	59,91 ± 6,1	71,66 ± 6,9	45,21 ± 4,8	21,54 ± 2,5
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,63 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,67 ± 0,4	0,41 ± 0,3

Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	5,52 ± 0,6	11,67 ± 1,8	40,87 ±3,9	51,99 ± 5,8
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	1,65 ± 1,8	1,03 ± 0,6
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	38,91 ± 4	54,33 ± 5,7	88,12 ± 9,1	92,35 ± 7,9
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	22,15 ± 2,4	29,24 ± 3,2	50,1 ± 5,2	72,55 ± 7,5
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	15,46 ± 1,7	19,18 ± 2,3	23,86 ± 2,8	6,15 ± 0,8
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	14,12 ± 1,3	17,63 ± 1,7	17,67 ± 1,9	6,75 ± 0,8
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	22,07 ± 3,2	19,02 ± 2,2	9,02 ± 1,1	6,1 ± 0,9
Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion of CD56+CD16+ cells, %	16,7 ± 1,9	15,4 ± 1,7	7,82 ± 1,4	5,79 ± 1,1
Активация МАТ + дополнительная стимуляция культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования Activation with mAbs + additional stimulation with HEK 293T cells on the 8th cultivation day				

Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	18,15 ± 2,5	9,34 ± 1,1	15,21 ± 1,7	5,38 ± 0,8
Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	5,5 ± 0,9	16,52 ± 1,7	44,37 ± 4,6	68,6 ± 7,1
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	59,91 ± 6,1	71,66 ± 6,9	36,69 ± 3,5	23,91 ± 2,6
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,63 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,21 ± 0,3	0,41 ± 0,2
Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	5,52 ± 0,6	11,67 ± 1,8	39,86 ± 4	48,54 ± 4,9
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	7,49 ± 7,2	1,07 ± 0,6
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	38,91 ± 4	54,33 ± 5,7	86,38 ± 8,2	96,64 ± 3,1
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	22,15 ± 2,4	29,24 ± 3,2	42,99 ± 4,5	73,02 ± 7,4
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	15,46 ± 1,7	19,18 ± 2,3	27,17 ± 2,9	7,21 ± 0,8

Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	14,12 ± 1,3	17,63 ± 1,7	25,65 ± 2,6	8,07 ± 0,9
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	22,07 ± 3,2	19,02 ± 2,2	20,33 ± 3	17,29 ± 1,8
Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion of CD56+CD16+ cells, %	16,7 ± 1,9	15,4 ± 1,7	22,1 ± 2,6	14,95 ± 1,8

Таблица 2. Рецепторный профиль и соотношение субпопуляций лимфоцитов при дополнительной стимуляции клеточной линией НЕК 293Т на 15-й день культивирования, $p < 0,05$

Table 2. Receptor profile and lymphocyte subpopulations after additional stimulation with the HEK 293T cells on the 15th cultivation day, $p < 0.05$

День культивирования Cultivation day	1-й (до активации) 1st (before activation)	7-й 7th	14-й 14th	21-й 21st
Активация МАТ однократно в начале культивирования A3:E20				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	18,15 ± 2,5	9,34 ± 1,1	6,89 ± 0,8	3,62 ± 0,5
Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	5,5 ± 0,9	16,52 ± 1,7	39,03 ± 4,2	73,52 ± 7,5
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	59,91 ± 6,1	71,66 ± 6,9	45,21 ± 4,8	21,54 ± 2,5
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,63 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,67 ± 0,4	0,41 ± 0,3
Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	5,52 ± 0,6	11,67 ± 1,8	40,87 ± 3,9	51,99 ± 5,8
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	1,65 ± 1,8	1,03 ± 0,6

Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	38,91 ± 4	54,33 ± 5,7	88,12 ± 9,1	92,35 ± 7,9
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	22,15 ± 2,4	29,24 ± 3,2	50,1 ± 5,2	72,55 ± 7,5
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	15,46 ± 1,7	19,18 ± 2,3	23,86 ± 2,8	6,15 ± 0,8
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	14,12 ± 1,3	17,63 ± 1,7	17,67 ± 1,9	6,75 ± 0,8
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	22,07 ± 3,2	19,02 ± 2,2	9,02 ± 1,1	6,1 ± 0,9
Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion of CD56+CD16+ cells, %	16,7 ± 1,9	15,4 ± 1,7	7,82 ± 1,4	5,79 ± 1,1
Активация МАТ + дополнительная стимуляция культурой HEK 293T на 15-й день культивирования Activation with mAbs + additional stimulation with HEK 293T cells on the 15th cultivation day				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	18,15 ± 2,5	9,34 ± 1,1	6,89 ± 0,8	6,55 ± 0,6
Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	5,5 ± 0,9	16,52 ± 1,7	39,03 ± 4,2	69,85 ± 7,2

Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	59,91 ± 6,1	71,66 ± 6,9	45,21 ± 4,8	20,58 ± 2,1
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,63 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,67 ±0,4	1,8 ± 0,3
Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	5,52 ± 0,6	11,67 ± 1,8	40,87 ±3,9	47,32 ± 5,5
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	1,65 ± 18	6,38 ± 0,7
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	38,91 ± 4	54,33 ± 5,7	88,12 ± 9,1	93,77 ± 6,1
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	22,15 ± 2,4	29,24 ± 3,2	50,1 ± 5,2	72,77 ± 6,9
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	15,46 ± 1,7	19,18 ± 2,3	23,86 ± 2,8	25,78 ± 2,8
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	14,12 ± 1,3	17,63 ± 1,7	17,67 ± 1,9	24,95 ± 2,7
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	22,07 ± 3,2	19,02 ± 2,2	9,02 ± 1,1	19,22 ± 2,3
Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion of CD56+CD16+ cells, %	16,7 ± 1,9	15,4 ± 1,7	7,82 ± 1,4	17,23 ± 1,9

Таблица 3. Рецепторный профиль и соотношение субпопуляций лимфоцитов при дополнительной стимуляции клеточной линией НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования, $p < 0,05$.

Table 3. Receptor profile and lymphocyte subpopulations after additional stimulation with the HEK 293T cells on the 8th and 15th cultivation day, $p < 0.05$.

День культивирования Cultivation day	1-й (до активации) 1st (before activation)	7-й 7th	14-й 14th	21-й 21st
Активация МАТ однократно в начале культивирования Activation with mAbs at the beginning of cultivation				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	18,15 ± 2,5	9,34 ± 1,1	6,89 ± 0,8	3,62 ± 0,5
Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	5,5 ± 0,9	16,52 ± 1,7	39,03 ± 4,2	73,52 ± 7,5
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	59,91 ± 6,1	71,66 ± 6,9	45,21 ± 4,8	21,54 ± 2,5
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,63 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,67 ± 0,4	0,41 ± 0,3
Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	5,52 ± 0,6	11,67 ± 1,8	40,87 ± 3,9	51,99 ± 5,8

Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	1,65 ± 1,8	1,03 ± 0,6
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	38,91 ± 4	54,33 ± 5,7	88,12 ± 9,1	92,35 ± 7,9
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	22,15 ± 2,4	29,24 ± 3,2	50,1 ± 5,2	72,55 ± 7,5
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	15,46 ± 1,7	19,18 ± 2,3	23,86 ± 2,8	6,15 ± 0,8
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	14,12 ± 1,3	17,63 ± 1,7	17,67 ± 1,9	6,75 ± 0,8
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	22,07 ± 3,2	19,02 ± 2,2	9,02 ± 1,1	6,1 ± 0,9
Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion of CD56+CD16+ cells, %	16,7 ± 1,9	15,4 ± 1,7	7,82 ± 1,4	5,79 ± 1,1
Активация МАТ + дополнительная стимуляция культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования Activation with mAbs + additional stimulation with HEK 293T cells on the 8th and 15th cultivation day				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	18,15 ± 2,5	9,34 ± 1,1	15,21 ± 1,7	8,2 ± 0,7

Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	5,5 ± 0,9	16,52 ± 1,7	44,37 ± 4,6	66,09 ± 6,8
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	59,91 ± 6,1	71,66 ± 6,9	36,69 ± 3,5	24,16 ± 4,6
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,63 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,21 ± 0,3	0,43 ± 0,2
Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	5,52 ± 0,6	11,67 ± 1,8	39,86 ± 4	27,07 ± 3,3
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	7,49 ± 7,2	49,58 ± 5,8
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	38,91 ± 4	54,33 ± 5,7	86,38 ± 8,2	94,65 ± 5,2
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	22,15 ± 2,4	29,24 ± 3,2	42,99 ± 4,5	85,32 ± 8,6
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	15,46 ± 1,7	19,18 ± 2,3	27,17 ± 2,9	58,79 ± 6,1
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	14,12 ± 1,3	17,63 ± 1,7	25,65 ± 2,6	57,05 ± 5,9
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	22,07 ± 3,2	19,02 ± 2,2	20,33 ± 3	55,07 ± 5,8

Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion of CD56+CD16+ cells, %	16,7 ± 1,9	15,4 ± 1,7	22,1 ± 2,6	54,74 ± 5,7
---	------------	------------	---------------	-------------

Таблица 4. Рецепторный профиль и соотношение субпопуляций лимфоцитов при стимуляции пролиферации клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования, $p < 0,05$.

Table 4. Receptor profile and lymphocyte subpopulations after stimulation with the HEK 293T cells at the beginning of cultivation, $p < 0.05$.

День культивирования Cultivation day	1-й (до активации) 1st (before activation)	4-й 4th	11-й 11th	14-й 14th
Активация МАТ однократно в начале культивирования Activation with mAbs at the beginning of cultivation				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	19,32 ± 2,1	14,67 ± 1,7	7,73 ± 0,9	6,04 ± 0,8
Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	3,5 ± 0,5	8,34 ± 0,9	41,66 ± 4,4	69,01 ± 7,2
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	52,15 ± 5,6	63,79 ± 6,5	57,48 ± 6	36,13 ± 3,8
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,60 ± 0,2	1,42 ± 0,2	0,66 ± 0,3	0,44 ± 0,1

Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	2,9 ± 0,4	7,27 ± 0,9	33,12 ± 3,6	57,64 ± 5,8
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,78 ± 0,2	2,94 ± 0,3	2,96 ±0,4	2,61 ±0,4
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	36,46 ± 3,9	44,3 ± 4,3	66,7 ± 7	87,77 ± 8,9
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	20,33 ± 2,2	29,08 ± 3,1	41,46 ± 4,4	62,65 ± 6,5
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	18,51 ± 2,1	17,35 ±1,8	16,3 ± 1,8	9,61 ± 1,1
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	15,5 ± 1,7	13,6 ± 1,5	11,57 ± 1,4	7,98 ± 0,9
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	20,09 ± 2,1	18,01 ±1,9	8,19 ± 0,9	5,41 ± 0,6
Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion ofCD56+CD16+ cells, %	17,23 ± 1,9	16,29 ± 1,8	7,44 ± 0,9	4,95 ± 0,5
Активация культурой HEK 293T однократно в начале культивирования Activation with HEK 293T cells at the beginning of cultivation				
Доля CD3-CD56+ клеток, % Proportion of CD3-CD56+ cells, %	19,32 ± 2,1	43,31 ± 4,4	27,3 ± 2,8	29,22 ± 3,1

Доля CD3+CD56+ клеток, % Proportion of CD3+CD56+ cells, %	3,5 ± 0,5	17,07 ± 1,9	24,96 ± 2,8	45,81 ± 4,8
Доля CD3+CD56- клеток, % Proportion of CD3+CD56- cells, %	52,15 ± 5,6	25,92 ± 2,5	45,85 ± 4,7	18,32 ± 2,1
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,60 ± 0,2	5,97 ± 0,7	3,41 ± 0,6	3,4 ± 0,5
Доля CD56+CD8+ клеток, % Proportion of CD56+CD8+ cells, %	2,9 ± 0,4	20,27 ± 2,5	13,12 ± 1,7	6,3 ± 0,8
Доля CD56+CD4+ клеток, % Proportion of CD56+CD4+ cells, %	0,78 ± 0,2	22,04 ± 2,6	45,11 ± 4,4	57,75 ± 5,9
Доля NKG2D+ клеток, % Proportion of NKG2D+ cells, %	36,46 ± 3,9	40,04 ± 4,6	58,36 ± 6,1	87,77 ± 9,1
Доля CD56+NKG2D+ клеток, % Proportion of CD56+NKG2D+ cells, %	20,33 ± 2,2	45,21 ± 4,8	63,89 ± 6,6	74,65 ± 7,6
Доля NKp30+ клеток, % Proportion of NKp30+ cells, %	18,51 ± 2,1	47,92 ± 4,9	52,75 ± 5,7	60,05 ± 5,9
Доля CD56+NKp30+ клеток, % Proportion of CD56+NKp30+ cells, %	15,5 ± 1,7	39,54 ± 4,1	48,49 ± 5,3	54,05 ± 5,6
Доля CD16+ клеток, % Proportion of CD16+ cells, %	20,09 ± 2,1	36,15 ± 3,8	40,82 ± 4,2	52,33 ± 5,3

Доля CD56+CD16+ клеток, % Proportion ofCD56+CD16+ cells, %	17,23 ± 1,9	34,95 ± 3,8	40,11 ± 4,4	51,47 ± 5,7
---	-------------	----------------	----------------	----------------

Таблица 5. Экспрессия ранних маркеров активации при стимуляции клеточной линией HEK 293T, проводимой в начале культивирования, $p < 0,05$.

Table 5. Early activation markers expression after stimulation with HEK 293T cells at the beginning of cultivation, $p < 0.05$.

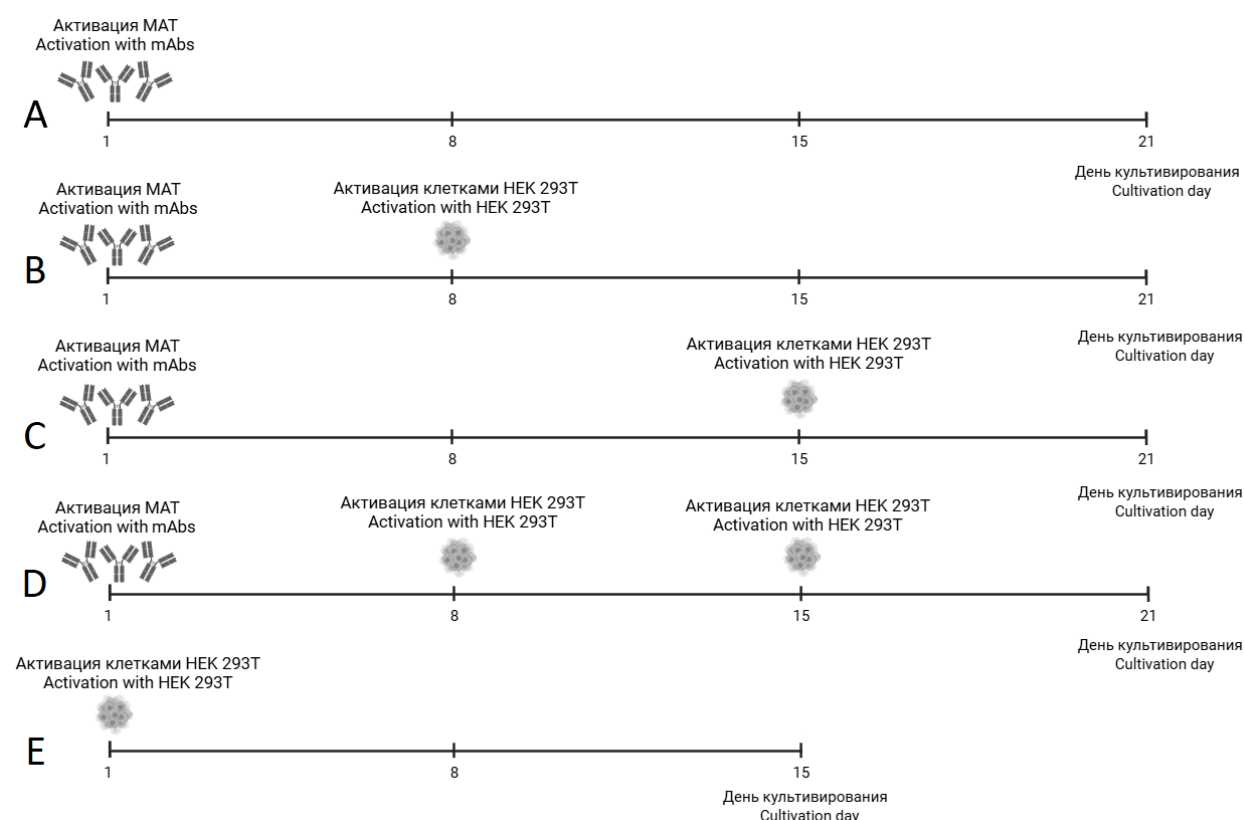
	Активация МАТ однократно в начале культивирования Activation with mAbs at the beginning of cultivation	Активация культурой HEK 293T однократно в начале культивирования Activation with HEK 293T cells at the beginning of cultivation
Доля CD38 ⁺ клеток, % Proportion of CD38 ⁺ cells, %	83,21 ± 8,4	58,33 ± 6,1
Доля CD56 ⁺ CD38 ⁺ клеток, % Proportion of CD56 ⁺ CD38 ⁺ cells, %	17,12 ± 1,9	36,69 ± 3,8
Доля CD69 ⁺ клеток, % Proportion of CD69 ⁺ cells, %	86,39 ± 8,6	27,1 ± 2,8

Доля CD56+CD69+ клеток, % Proportion of CD56+CD69+ cells, %	17,3 ± 1,8	22,1 ± 2,2
Доля CD25+ клеток, % Proportion of CD25+ cells, %	64,57 ± 6,6	24,88 ± 2,6
Доля CD56+CD25+ клеток, % Proportion of CD56+CD25+ cells, %	6,07 ± 0,8	23,69 ± 2,6

РИСУНКИ

Рисунок 1. Различные подходы к активации пролиферации культивируемых лимфоцитов.

Figure 1. Different approaches to the activation and proliferation of cultured lymphocytes.



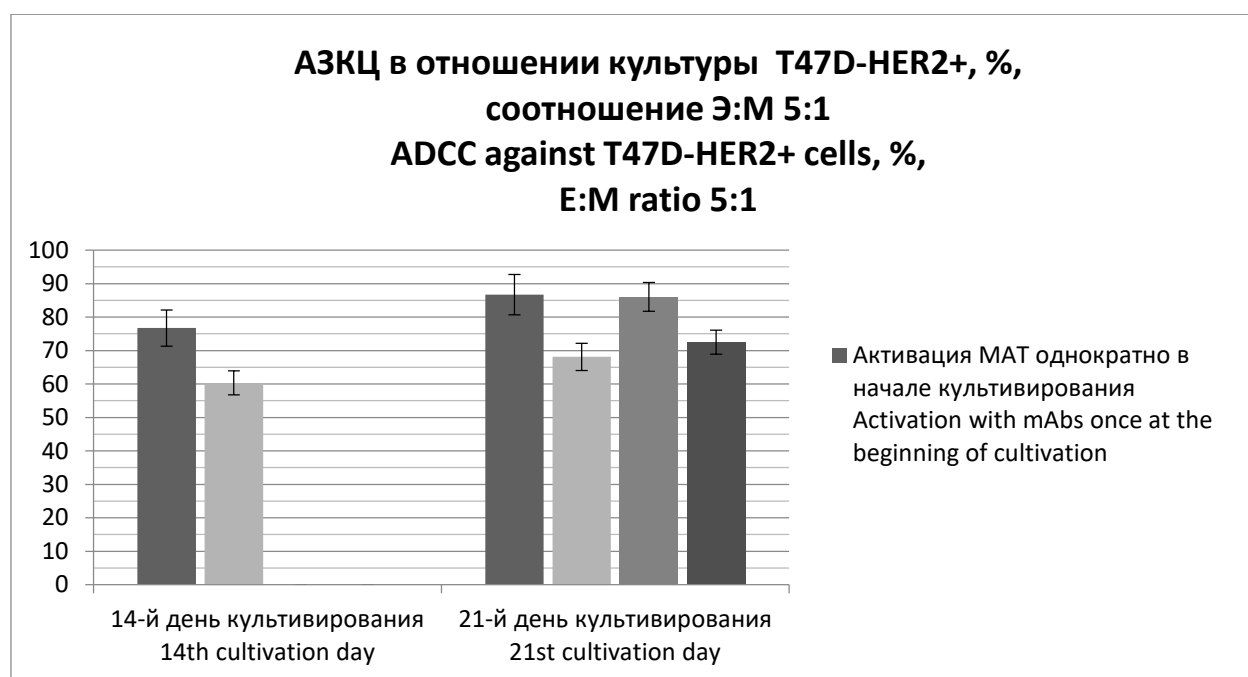
Обозначения: А – активация только с помощью МАТ в начале культивирования; В – активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования; С – активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 15-й день культивирования; D – активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования; E – активация только клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования

A – activation with mAbs at the beginning of cultivation; B – activation with mAbs and additional stimulation with HEK 293T cells on the 8th cultivation day; C – activation with mAbs and additional stimulation with HEK 293T cells on the 15th

cultivation day; D – activation with mAbs and additional stimulation with HEK 293T cells on the 8th and 15th cultivation day; E – activation with HEK 293T cells at the beginning of cultivation

Рисунок 2. Цитотоксичность лимфоцитов, активированных МАТ и культурой HEK 293T, $p < 0.05$.

Figure 2. Cytotoxicity of lymphocytes after activation with mAbs and stimulation with HEK 293T cells, $p < 0.05$.



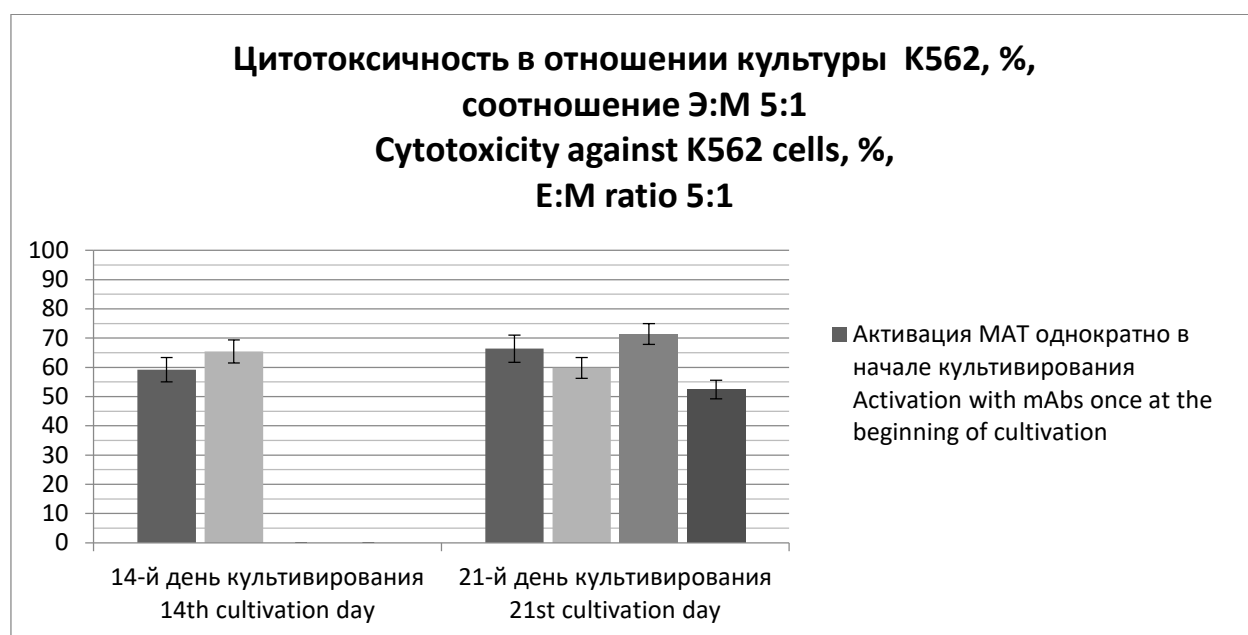
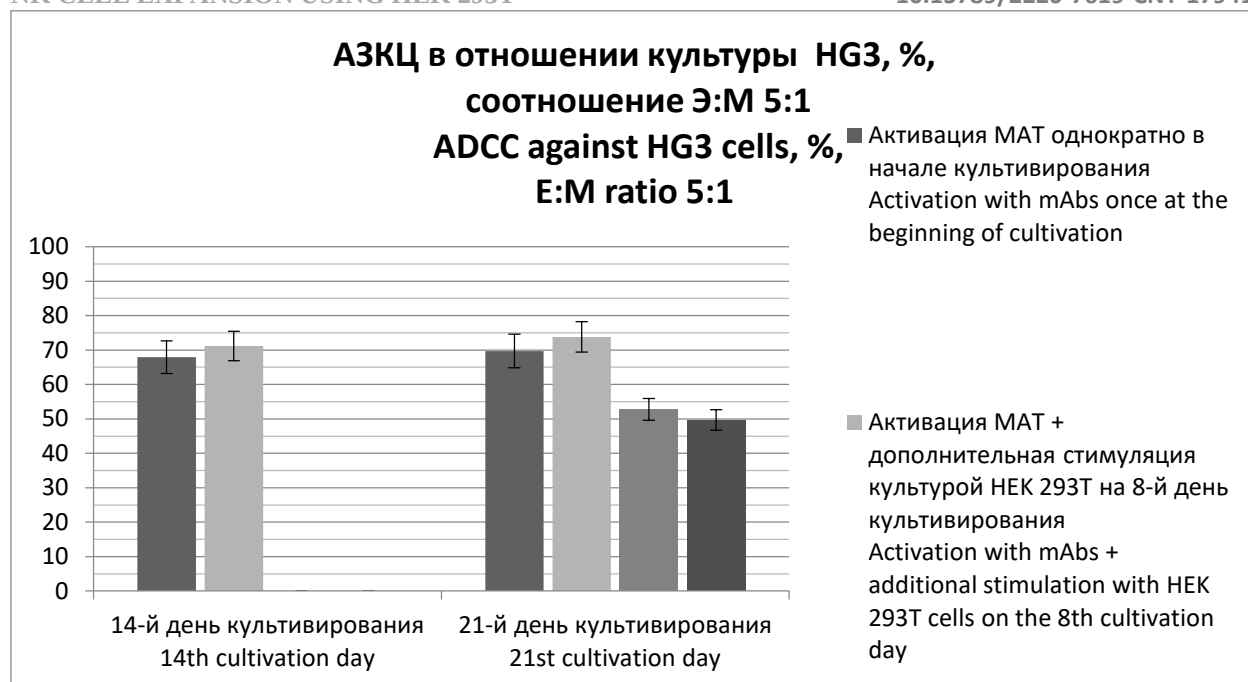
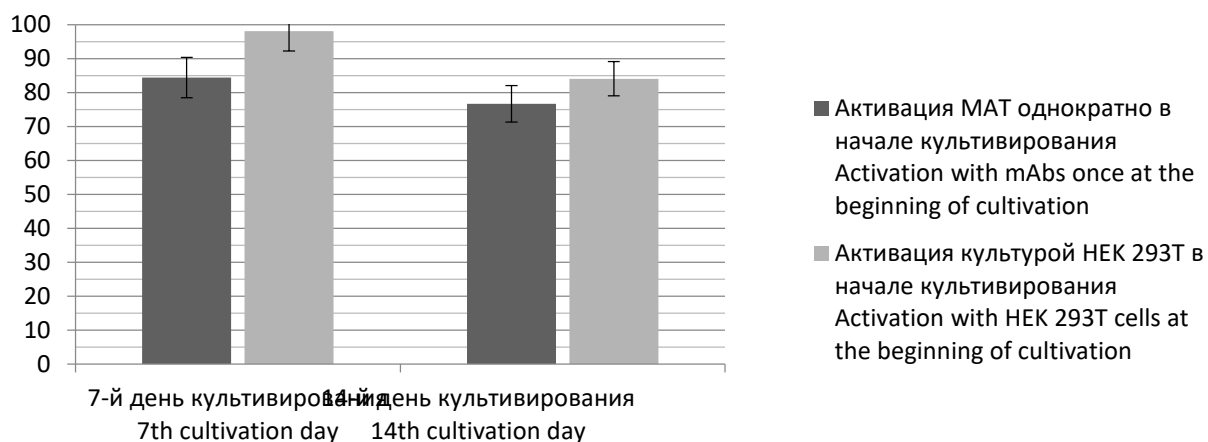


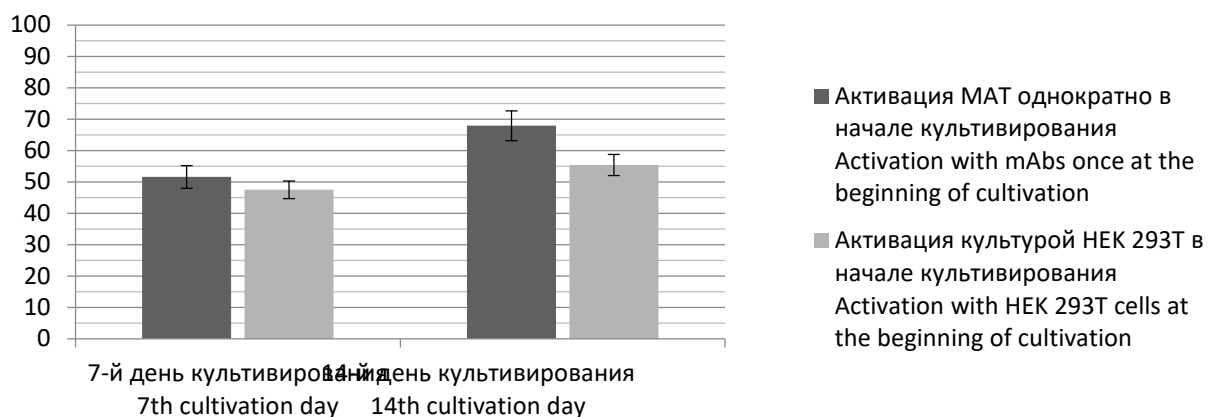
Рисунок 3. Цитотоксичность лимфоцитов, активированных клеточной линией HEK 293Т в начале культивирования, $p < 0,05$.

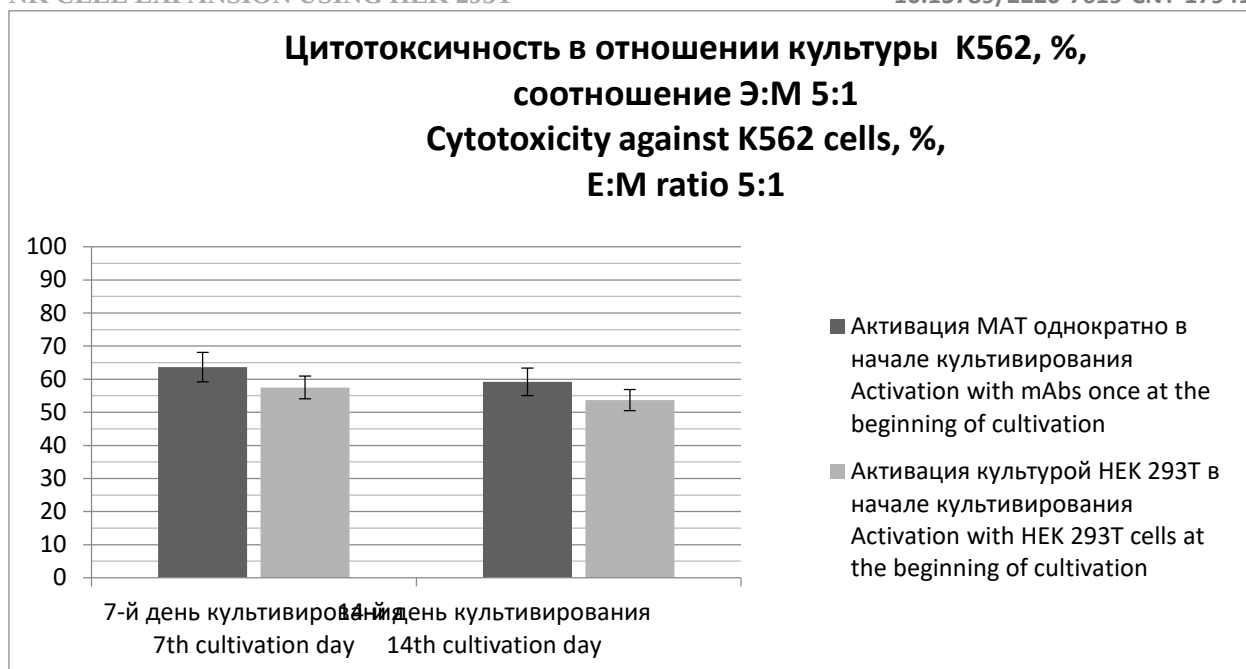
Figure 3. Cytotoxicity of lymphocytes after stimulation with HEK 293T cells at the beginning of cultivation, $p < 0.05$.

Цитотоксичность в отношении культуры T47D-HER2+, %, соотношение Э:М 5:1
ADCC against T47D-HER2+ cells, %, E:M ratio 5:1



Цитотоксичность в отношении культуры HG3, %, соотношение Э:М 5:1
ADCC against HG3 cells, %, E:M ratio 5:1





ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Федорова Полина Олеговна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии¹;

младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии²;
лаборант-исследователь лаборатории клеточного иммунитета³

Ученая степень, ученое звание: отсутствует.

адрес: Россия, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 стр. 2;

телефон: 89102941178;

e-mail: ppolite@mail.ru

Fedorova Polina Olegovna, assistant of microbiology, virology and immunology department¹, junior researcher of laboratory of applied virology²;

laboratory research assistant of laboratory of cellular immunity³.

Academic degree, academic title: none.

address: Russia, 115522, Moscow, Kashyrskoe Sh., 24-2;

telephone: 89102941178;

e-mail: ppolite@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Чикилева Ирина Олеговна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории Клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

ORCID ID: 0000-0003-0769-1695

Chikileva Irina Olegovna, PhD (in biology), senior researcher of laboratory of cellular immunity^c

^cResearch Institute of Experimental Therapy and Diagnostics of Tumor, NN Blokhin National Medical Center of Oncology;

ORCID ID: 0000-0003-0769-1695

Киселевский Михаил Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией Клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

ORCID ID: 0000-0002-0132-167X

Kiselevskiy Mikhail Valentinovich, doctor of medical sciences, professor, the head of laboratory of cellular immunity^c

^cResearch Institute of Experimental Therapy and Diagnostics of Tumor, NN Blokhin National Medical Center of Oncology;

ORCID ID: 0000-0002-0132-167X

Блок 3. Метаданные статьи

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HEK 293T В КАЧЕСТВЕ
АКТИВАТОРА ПРОЛИФЕРАЦИИ НК-КЛЕТОК В КОНТЕКСТЕ
РАЗРАБОТКИ CAR-НК-ТЕРАПИИ

CAR-NK THERAPY: NK CELL EXPANSION USING HEK 293T

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

СОКРАЩЕННОЕ НАЗВАНИЕ СТАТЬИ: ФИДЕРНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ
ЭКСПАНСИИ НК-КЛЕТОК

NK CELL EXPANSION USING HEK 293T

Ключевые слова: CAR-терапия, CAR-НК-терапия, обогащение НК-клеток,
моноклональные антитела, аллогенные фидерные клетки, HEK 293T.

Keywords: CAR therapy, CAR NK therapy, expansion of NK cells, monoclonal
antibodies, allogeneic feeder cells, HEK 293T.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 17,

количество таблиц – 5,

количество рисунков – 3.

02.06.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
1	Mazinani, M., Rahbarizadeh, F. New cell sources for CAR-based immunotherapy. Biomark Res. 2023; 11, 49.	-	https://doi.org/10.1186/s40364-023-00482-9
2	Chohan KL, Siegler EL, Kenderian SS. CAR-T Cell Therapy: the Efficacy and Toxicity Balance. Curr Hematol Malig Rep. 2023 Apr;18(2):9-18.	-	https://doi.org/10.1007/s11899-023-00687-7
3	Choi G, Shin G, Bae S. Price and prejudice? the value of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(19):12366.	-	https://doi.org/10.3390/ijerph191912366
4	Shah N, Li L, McCarty J, Kaur I, Yvon E, Shaim H, et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer	-	https://doi.org/10.1111/bjh.14570

	cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. Br J Haematol. 2017;177(3):457–66.		
5	Exley MA, Lynch L, Varghese B, Nowak M, Alatrakchi N, Balk SP. Developing understanding of the roles of CD1d-restricted T cell subsets in cancer: reversing tumor-induced defects. Clin Immunol. 2011;140(2):184–95.	-	https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.04.017
6	Lu H, Zhao X, Li Z, Hu Y, Wang H. From CAR-T cells to CAR-NK cells: a developing immunotherapy method for hematological malignancies. Front Oncol. 2021;11:720501.	-	https://doi.org/10.3389/fonc.2021.720501
7	Gong, Y., Klein Wolterink, R.G.J., Wang, J. et al. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy. J Hematol Oncol 14, 73 (2021).	-	https://doi.org/10.1186/s13045-021-01083-5

8	Schmid H, Schneidawind C, Jahnke S, Kettemann F, Secker K-A, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, Kanz L, Savage PB and Schneidawind D (2018) Culture-Expanded Human Invariant Natural Killer T Cells Suppress T-Cell Alloreactivity and Eradicate Leukemia. Front. Immunol. 9:1817.	-	https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01817
9	Pampusch MS, Haran KP, Hart GT, Rakasz EG, Rendahl AK, Berger EA, Connick E, Skinner PJ. Rapid Transduction and Expansion of Transduced T Cells with Maintenance of Central Memory Populations. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019 Sep 30;16:1-10.	-	https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.007
10	Liu Y, Liu Z, Yang Y, Cui J, Sun J, Liu Y. The prognostic and biology of tumour-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy of cancer. Br J Cancer. 2023 Oct;129(7):1041-1049.	-	https://doi.org/10.1038/s41416-023-02321-y

11	Rölle A, Pollmann J, Ewen E, Le VTK, Halenius A, Hengel H, et al. IL-12- producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. J Clin Invest (2014) 124:5305–16.	-	https://doi.org/10.1172/JCI77440
12	Phan MT, Kim J, Koh SK, Lim Y, Yu H, Lee M et al. Selective Expansion of NKG2C+ Adaptive NK Cells Using K562 Cells Expressing HLA-E. Int J Mol Sci. 2022 Aug 20;23(16):9426.	-	https://doi.org/10.3390/ijms23169426
13	Гельм Ю.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю., Константинова Т.В., Михайловский Н.В., Рыбачук В.А., Абакушина Е.В., Иванов С.А., Каприн А.Д. Опыт культивирования НК-клеток человека с фидерными клетками in vitro. Медицинская иммунология. 2022;24(3):481-490.	Gelm Yu.V., Pasova I.A., Grivtsova L.Yu., Konstantinova T.V., Mikhaylovsky N.V., Rybachuk V.A., Abakushina E.V., Ivanov S.A., Kaprin A.D. In vitro experience of human	https://doi.org/10.15789/1563-0625-IVE-2481

		natural killer cell culture with feeder cells. Medical Immunology (Russia). 2022;24(3):481-490. (In Russ.)	
14	Ojo EO, Sharma AA, Liu R, Moreton S, Checkley-Luttge MA, Gupta K et al. Membrane bound IL-21 based NK cell feeder cells drive robust expansion and metabolic activation of NK cells. Sci Rep. 2019 Oct 17;9(1):14916.	-	https://doi.org/10.1038/s41598-019-51287-6
15	Gómez García LM, Escudero A, Mestre C, Fuster Soler JL, Martínez AP, Vagace Valero JM et al. Phase 2 Clinical Trial of Infusing Haploidentical K562-mb15-41BBL-Activated and Expanded Natural Killer Cells as Consolidation Therapy for Pediatric Acute	-	https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.01.013

	Myeloblastic Leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2021 May;21(5):328-337.		
16	Muñoz Builes M, Vela Cuenca M, Fuster Soler JL, Astigarraga I, Pascual Martínez A, Vagace Valero JM et al. Study protocol for a phase II, multicentre, prospective, non-randomised clinical trial to assess the safety and efficacy of infusing allogeneic activated and expanded natural killer cells as consolidation therapy for paediatric acute myeloblastic leukaemia. BMJ Open. 2020 Jan 8;10(1):e029642.	-	https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029642
17	Wang C, Li N, Li Y, Hou S, Zhang W, Meng Z, Wang S, Jia Q, Tan J, Wang R, Zhang R. Engineering a HEK-293T exosome-based delivery platform for efficient tumor-targeting chemotherapy/internal irradiation combination therapy. J Nanobiotechnology. 2022 May 31;20(1):247.	-	https://doi.org/10.1186/s12951-022-01462-1

18	Scarrott JM, Johari YB, Pohle TH, Liu P, Mayer A, James DC. Increased recombinant adeno-associated virus production by HEK293 cells using small molecule chemical additives. <i>Biotechnol J</i> . 2023 Mar;18(3):e2200450.	-	https://doi.org/10.1002/biot.202200450
19	He X, He Q, Yu W, Huang J, Yang M, Chen W, Han W. Optimized protocol for high-titer lentivirus production and transduction of primary fibroblasts. <i>J Basic Microbiol</i> . 2021 May;61(5):430-442.	-	https://doi.org/10.1002/jobm.202100008
20	Gao Y, Bergman I. Anti-tumor memory CD4 and CD8 T-cells quantified by bulk T-cell receptor (TCR) clonal analysis. <i>Front Immunol</i> . 2023 Mar 23;14:1137054.	-	https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1137054
21	Tian G, Barragán GA, Yu H, Martinez-Amador C, Adaikkalavan A, Rios X, Guo L, Drabek JM, Pardias O, Xu X, Montalbano A, Zhang C, Li Y, Courtney AN, Di Pierro EJ, Metelitsa LS. PRDM1 is a key regulator	-	https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-24-0259

	of the natural killer T-cell central memory program and effector function. Cancer Immunol Res. 2025 Jan 16.		
22	Lowry LE, Zehring WA. Potentiation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: A Review of Literature. Front Immunol. 2017 Sep 1;8:1061.	-	https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01061
23	Bihl F, Germain C, Luci C, Braud VM. Mechanisms of NK cell activation: CD4(+) T cells enter the scene. Cell Mol Life Sci. 2011 Nov;68(21):3457-67.	-	https://doi.org/10.1007/s00018-011-0796-1
24	Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Bright RK, Kennedy RC. Tumor immunity against a simian virus 40 oncoprotein requires CD8+ T lymphocytes in the effector immune phase. J Virol. 2010 Jan;84(2):883-93.	-	https://doi.org/10.1128/JVI.01512-09
25	Reus JB, Trivino-Soto GS, Wu LI, Kokott K, Lim ES. SV40 Large T Antigen Is Not Responsible for the Loss of STING in 293T Cells but Can Inhibit cGAS-STING Interferon Induction. Viruses. 2020 Jan 24;12(2):137.	-	https://doi.org/10.3390/v12020137

26	Wasylishen AR, Lozano G. Attenuating the p53 Pathway in Human Cancers: Many Means to the Same End. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Aug 1;6(8):a026211.	-	https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026211
27	Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, Lauer P, Brockstedt DG, Knoblaugh SE, Hämmerling GJ, Schell TD, Garbi N, Greenberg PD. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity. 2016 Aug -16;45(2):389-401.	-	https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.011
28	Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M. et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. Sci Rep. 2020; 10, 18996.	-	https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8
29	Hasan AN, Selvakumar A, Shabrova E, Liu XR, Afridi F, Heller G, Riviere I, Sadelain M, Dupont B, O'Reilly	-	https://doi.org/10.1111/cei.12816 doi:

	RJ. Soluble and membrane-bound interleukin (IL)-15 R α /IL-15 complexes mediate proliferation of high-avidity central memory CD8 ⁺ T cells for adoptive immunotherapy of cancer and infections. Clin Exp Immunol. 2016 Nov;186(2):249-265.		
30	Bae DS, Lee JK. Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line. Blood Res. 2014 Sep;49(3):154-61.	-	https://doi.org/10.5045/br.2014.49.3.154
31	Palen K, Zurko J, Johnson BD, Hari P, Shah NN. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells from cryopreserved peripheral blood cells: time for a collect-and-freeze model? Cytotherapy. 2021 Nov;23(11):985-990.	-	https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.07.015
32	Gurney M, Kundu S, Pandey S, O'Dwyer M. Feeder Cells at the Interface of Natural Killer Cell Activation, Expansion and Gene Editing. Front Immunol. 2022 Feb 11;13:802906.	-	https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.802906

