DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-27-37

Опыт разработки и масштабирования протокола производства клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами, для клинического применения

Е.А. Кулаковская, В.Е. Бельчиков, В.А. Ведмедская, М.С. Фадеева, Е.А. Малахова, Э.Я. Мусаева, О.Б. Лодоева, С.С. Ларин, М.И. Лукашина, А.В. Кибардин, М.Д. Моллаев, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченок, А.К. Мелькова, Т.Ю. Завидный, П.Е. Трахтман, Л.Н. Шелихова, Д.Е. Першин, М.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.05.2025
Принята к печати 02.06.2025

EDN: CXKFLR

Применение НК-клеток является перспективным направлением клеточной терапии при гемобластозах. Разработка протокола экспансии обогащенного НК-лимфоцитами биомедицинского клеточного продукта – актуальная задача клинической биотехнологии. На основе массива научных и клинических исследований нами был выбран протокол экспансии НК-лимфоцитов с использованием модифицированной фидерной линии K562 и стартовой фракции мононуклеаров периферической крови, не включающий этап деплеции $CD3^+$-лимфоцитов. В данной работе представлены результаты валидационных процессов производства обогащенного НК-лимфоцитами биомедицинского клеточного продукта. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Полученные клеточные продукты удовлетворяли всем заявленным критериям контроля качества, имели высокий процент содержания НК-лимфоцитов и демонстрировали выраженную цитотоксическую активность в отношении клеточных линий THP-1 и Jeko-1. Показатели кратности экспансии позволили достичь целевой клинической дозы во всех процессах. Уровень экспрессии поверхностных маркеров НК-клеток после экспансии соответствовал активированному и высокопролиферативному фенотипу. Остаточные лимфоциты были представлены в основном Т-клетками с эффекторным фенотипом и достоверным снижением процентного содержания TCRαβ относительно стартовой фракции. Полученные данные дают основание для проведения клинического исследования выполнимости и безопасности применения инфузий клеточного продукта, произведенного согласно данному протоколу, в терапии рефрактерного лейкоза у детей.

Ключевые слова: *острый рефрактерный лейкоз, НК-клетки, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, иммунотерапия, фидерная линия*

Кулаковская Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 27–37. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-27-37

Контактная информация:
Кулаковская Елена Алексеевна,
младший научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: elena.kulakovskaya@dgoi.ru

Experience in developing and scaling a protocol for NK lymphocyte enriched cellular product manufacturing for clinical application

E.A. Kulakovskaya, V.E. Belchikov, V.A. Vedmedskaia, M.S. Fadeeva, E.A. Malakhova, E.Ya. Musaeva, O.B. Lodoeva, S.S. Larin, M.I. Lukashina, A.V. Kibardin, M.D. Mollaev, Ya.O. Muzalevskii, A.S. Kazachenok, A.K. Melkova, T.Yu. Zavidnyi, P.E. Trakhtman, L.N. Shelikhova, D.E. Pershin, M.A. Maschan

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.05.2025
Accepted 02.06.2025

NK cell-based therapy is a promising area for hematological malignancies treatment. The development of an expansion protocol for NK lymphocyte-enriched biomedical cell product is a pressing issue in clinical biotechnology. Based on numerous scientific and clinical studies, we have settled on the NK lymphocyte expansion protocol with a modified feeder line K562 and peripheral blood mononuclear cells as a starting fraction, not including $CD3^+$ lymphocyte depletion step. In this paper, we present the results of a validation process of NK lymphocyte-enriched biomedical cell product manufacturing. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. The resulting cell products met all stated quality control criteria, contained a high percentage of NK cells, and demonstrated strong cytotoxic activity against the THP-1 and Jeko-I cell lines. Expansion folds allowed us to achieve the desired clinical dosage in all processes. The surface marker expression profile of the expanded NK cells corresponded to an activated and highly proliferative phenotype. The residual lymphocytes were represented mainly by T cells with an effector phenotype, and a significant decrease in TCRαβ percentage was observed compared to the initial fraction. These data provide the basis for a clinical study of the feasibility and safety of the infusions of the cellular products produced according to this protocol for pediatric refractory leukemia treatment.

Key words: *acute refractory leukemia, NK cells, hematopoietic stem cell transplantation, immunotherapy, feeder cell line*

Kulakovskaya E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 27–37.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-27-37

Correspondence:
Elena A. Kulakovskaya,
a junior researcher at the Laboratory of Transplantation Immunology and Immunotherapy of Hemoblastoses of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: elena.kulakovskaya@dgoi.ru

В общей структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями пациентов в возрасте до 18 лет более трети составляют острые лейкозы. Однако, несмотря на существенное усовершенствование тактики диагностики и лечения, у 20% детей с острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ) и у 40% детей с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) различные комбинации режимов полихимиотерапии не приводят к стойкой ремиссии, а возможности интенсификации цитотоксической терапии исчерпаны [1].

Использование аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) позволяет улучшить прогноз почти у половины пациентов с резистентными и рецидивирующими формами острого лейкоза [1–4]. Тем не менее остается когорта, в которой, несмотря на проведенную терапию, новый рецидив или посттрансплантационные осложнения приводят к смерти пациента [5, 6].

Применение инновационных типов гуморальной и клеточной иммунотерапии [7–12] в комбинации с алло-ТГСК дает дополнительный шанс пациентам с рефрактерным течением острого лейкоза, решая целый ряд задач: снижение токсичности как непосредственно противоопухолевой терапии, так и режима предтрансплантационного кондиционирования; снижение риска посттрансплантационных осложнений; эффективная элиминация резистентных к другим видам терапии бластов. Значительным преимуществом НК-клеточной терапии в данном контексте является отсутствие выраженной аллореактивности в отношении здоровых негемопоэтических тканей, что позволяет получать выраженный противолейкемический эффект без увеличения риска реакции «трансплантат против хозяина». Кроме того, НК-лимфоциты обладают естественной противоопухолевой активностью, которая реализуется по антиген-независимому пути, и таким образом делает их универсальными эффекторами по отношению к бластным клеткам, нередко проявляющим фенотипическую пластичность [13–16]. В ряде клинических исследований было показано, что более высокие дозы НК-клеток, поступивших с трансплантатом, а также более ранняя посттрансплантационная реконституция НК-лимфоцитов ассоциированы с более низким риском рецидива и улучшением выживаемости после алло-ТГСК [17–20], что подтверждает важность оптимизации как количественных, так и функциональных характеристик НК-клеток для улучшения клинических исходов трансплантации.

Существует 2 основные стратегии получения дополнительных терапевтических доз НК лимфоцитов: 1) последовательная магнитная селекция большого количества $CD56^+CD3^-$-клеток из продукта лейкофереза [21, 22]; 2) *ex vivo* экспансия НК-лимфоцитов с использованием различных активирующих агентов [23].

Несмотря на ряд преимуществ магнитной селекции, таких как скорость получения финального продукта и минимальный риск контаминации за счет отсутствия этапа культивации, сегодня все чаще предпочтение отдается именно *ex vivo* экспансии, поскольку результаты множества научных и клинических исследований подтверждают более выраженный противолейкемический и противовирусный эффекты НК-клеток, прошедших дополнительный этап активации и экспансии [24–29].

Стратегия выбора протокола экспансии построена на оценке взаимодействия 3 групп факторов: 1) источник НК-лимфоцитов; 2) тип активирующего агента; 3) использование магнитной сепарации на одном из этапов процесса.

Для экспансии НК-клеток может быть использована периферическая кровь здорового донора гемопоэтических стволовых клеток, позволяющая получить достаточное для старта процесса количество НК-клеток из сравнительно небольшого объема. В некоторых клинических протоколах источником высокопролиферативных НК-клеток служит пуповинная кровь, однако ее использование ограничено доступностью биоматериала и сложностью использования в контексте алло-ТГСК, включая обязательный этап $CD3^+$-деплеции в связи с риском Т-клеточной аллореактивности по отношению к донору и трансплантату.

Исходя из состава и абсолютного количества клеток в стартовой фракции могут быть использованы более безопасные, но дающие меньшую экспансию неклеточные активирующие агенты (различные комбинации цитокинов, конъюгированные с антителами синтетические частицы [30–32]) или же многократно увеличивающие выход НК-лимфоцитов фидерные клеточные линии, которые в то же время требуют тщательного контроля качества финального продукта [33].

В рамках модификации клеточного состава возможны различные степени вмешательства: 1) экспансия чистой фракции $CD3^-CD56^+$-лимфоцитов (минимизирует риск примеси аллореактивных Т-лимфоцитов в финальном продукте при более низкой эффективности экспансии НК-клеток); 2) использование нативной фракции мононуклеаров, в которой поддерживающее микроокружение способствует НК-клеточной пролиферации, однако даже в случае частичной совместимости донора может потребоваться этап удаления из продукта остаточных Т-клеток.

Несмотря на значительный терапевтический потенциал, на сегодняшний день в России не зарегистрированы клинические исследования применения НК-лимфоцитов после экспансии в качестве профи-

лактики рецидива острого рефрактерного лейкоза после алло-ТГСК.

Целью настоящего исследования стали разработка и валидация протокола получения обогащенного НК-лимфоцитами биомедицинского клеточного продукта (НК БМКП), а также детальный анализ его фенотипических и функциональных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Клеточные продукты

В работе представлены характеристики НК БМКП (n = 7), полученных путем экспансии из материала 7 здоровых взрослых доноров в период с октября 2023 г. по март 2024 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Общая схема процесса получения клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами

В качестве основы был использован протокол, опубликованный N. Lapteva и соавт. (2012) [34]. Источником НК-клеток для экспансии служили мононуклеары здоровых доноров, выделенные из периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности. Для получения НК БМКП к мононуклеарам добавляли фидерную линию K562 и культивировали в течение 14 дней в питательной среде, содержащей интерлейкин (IL)-2.

Источник клеток и параметры культивации

Все этапы процесса, включающие выделение мононуклеаров, культивирование, а также финальную валидацию и заготовку клеточного продукта, были проведены в соответствии с правилами надлежащей производственной практики в условиях чистых помещений.

Для выделения стартовой фракции мононуклеаров были использованы пробирки BD Vacutainer CPT (Becton Dickinson, США) согласно инструкции производителя.

Затем с помощью проточной цитометрии оценивали концентрацию субпопуляций лимфоцитов в полученном образце мононуклеаров (см. раздел «Оценка состава клеточных продуктов») и, исходя из полученных значений, рассчитывали объем стартовой фракции, содержащий 4,0E+06 НК-клеток. К этому объему добавляли 40,0E+06 клеток заранее заготовленной фидерной культуры (см. раздел «Клеточные линии»).

Культивацию проводили в одноразовом биореакторе G-Rex100M (Wilson Wolf Manufacturing, США), рассчитанном на максимальный объем 1000 мл. В качестве питательной среды использовали NK MACS GMP Medium (Miltenyi Biotec, Германия) с добавлением 10% человеческого тромболизата (см. раздел «Изготовление лизата человеческих тромбоцитов») и рекомбинантного человеческого IL-2 (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 10 Ед/мл.

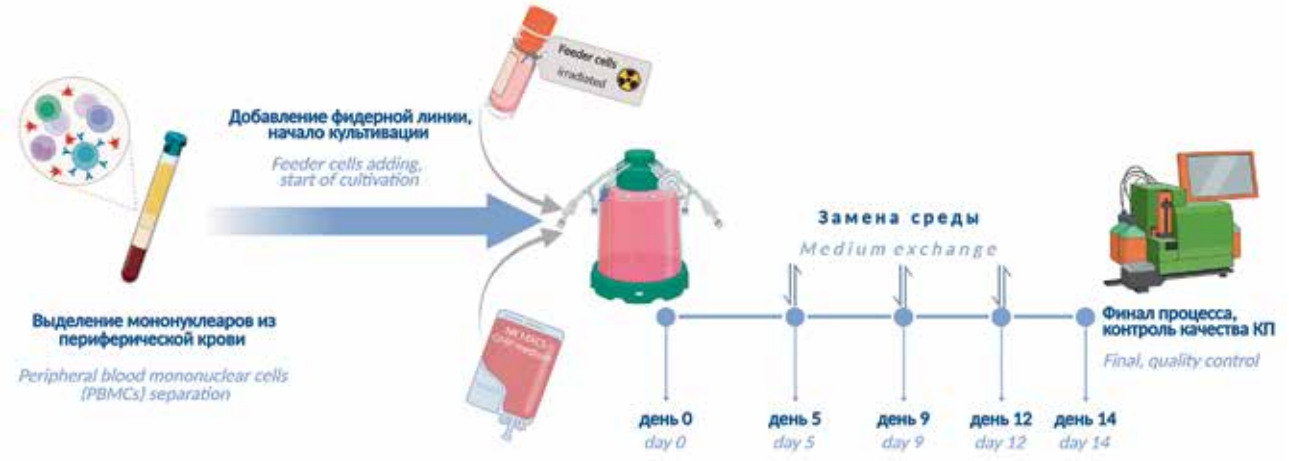
Стартовый объем среды для культивации составлял 500 мл, на 5-й день добавляли еще 500 мл, а на 9-й и 12-й дни производили замену половины культивационного объема. Детальная схема процесса приведена на *рисунке 1*.

Клеточные линии

Суспензионные клеточные линии миелоидной лейкемии THP-1 (TIB-202, ATCC, США) и В-лимфоидных бластов Jeko-1 (CRL-3006, ATCC, США)

Рисунок 1
Схема процесса экспансии НК БМКП
На рисунке отражены основные этапы производства и контроля качества клеточного продукта

Figure 1
Scheme of the NK cell product expansion process
The main steps of the NK cell product manufacturing and quality control are shown



были получены от производителя в виде замороженных аликвот, хранящихся в жидком азоте, и после разморозки культивировались в среде RPMI-1640 (Capricorn Scientific, Германия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Cytiva, HyClone, США; регион происхождения Северная Америка). Обе линии были модифицированы в целях стабильной экспрессии красного флуоресцентного белка mKate путем лентивирусной трансдукции коммерческим реагентом NucLight Red (EF1a, Puro, Essen BioScience, Германия) с последующей селекцией на пуромицине (ThermoFisher Scientific, США).

Фидерная линия была предоставлена коллегами из лаборатории молекулярной иммунологии под руководством С.С. Ларина (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева). В качестве фидера была использована клеточная линия K562, стабильно экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) и мембранные формы IL-21, CD137-лиганда (41BB) и комплекса IL-15/IL-15Rα. Перед биобанкированием было проведено γ-облучение клеток фидера суммарной дозой 100 Гр на приборе Gammacell 3000 Elan (Best Theratronics, США).

Изготовление лизата человеческих тромбоцитов

Концентраты тромбоцитов (КТ) были получены от здоровых доноров-добровольцев, прошедших обследование и подписавших информированное согласие на проведение процедуры автоматического афереза с лейкоредукцией (Terumo BCT, США, версия 7.0). После стандартной обработки было проведено пулирование полученных КТ (объединение равных объемов КТ от 10 разных доноров в целях нивелирования индивидуальных особенностей). На финальном этапе проводили несколько циклов замораживания/размораживания полученного пула с последующим центрифугированием для получения очищенного от дебриса лизата, к которому затем добавляли гепарин в концентрации 15 Ед/мл (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия). После проведения микробиологического контроля полученный продукт в течение года хранился при температуре –80°С до востребования.

Контроль качества клеточного продукта

Контроль качества включал в себя оценку субпопуляционного состава (дни 0, 9, 12 и 14), а также тесты на микробиологическую безопасность (дни 0 и 14) и контроль присутствия остаточного фидера (день 14).

Продукт признавался микробиологически безопасным при отсутствии микоплазмы (выявление методом полимеразной цепной реакции с помощью набора Евроген, Myco Real-Time, Россия), эндотоксина (Endosafe, LAL test, США) и отрицательном результате теста на рост микроорганизмов (BD BACTEC, США).

Заключение об отсутствии в финальном продукте остаточного фидера делалось по результатам детекции методом проточной цитометрии. Исходя из данных литературы и параметров чувствительности используемых приборов, нами было установлено пороговое значение не более 0,5% GFP-положительных событий от 1,0E+06 событий из региона живых (7AAD-) клеток.

Оценка состава клеточного продукта

Определение концентрации клеток в продукте проводили волюметрическим методом на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). Развернутый субпопуляционный состав клеточного продукта оценивали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) с использованием многоцветных панелей коммерческих моноклональных антител (*таблица 1*). Анализ цитометрических данных проводили в программе CytExpert, версия 2.3.0.84 (Beckman Coulter, США).

Оценка функциональной активности клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами

Полученный на 14-й день клеточный продукт соединяли с экспрессирующими красный флуоресцентный белок клеточными линиями THP-1 и Jeko-1 в соотношении НК:THP-1/Jeko-1 как 1:1 и 5:1, и проводили съемку на приборе IncuCyte S3 (Sartorius AG, Германия). Изображения регистрировали каждый час в течение 3 сут, а затем проводили их анализ с помощью программного обеспечения IncuCyte Software (v2019B) (Sartorius AG, Германия). Репрезентативные примеры исходного изображения и результаты его анализа представлены на *рисунке 2*. Количество красных объектов с течением времени отражает пролиферативную активность опухолевой линии, соответственно, НК БМКП считали функционально состоятельным, если он был способен подавлять пролиферацию бластов относительно контроля. Интегральным показателем пролиферации считали площадь под кривой (area under the curve, AUC) в координатах времени и количества красных объектов на лунку. Данные нормализованы к начальному значению красных объектов на лунку, принятому за 100%.

Статистический анализ и обработка данных

Обработка и статистический анализ данных проводились в программе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Для статистического анализа были использованы критерии Манна–Уитни, Уилкоксона и коэффициент корреляции Спирмена. Уровень статистической значимости описывался как * и ** для значений $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно.

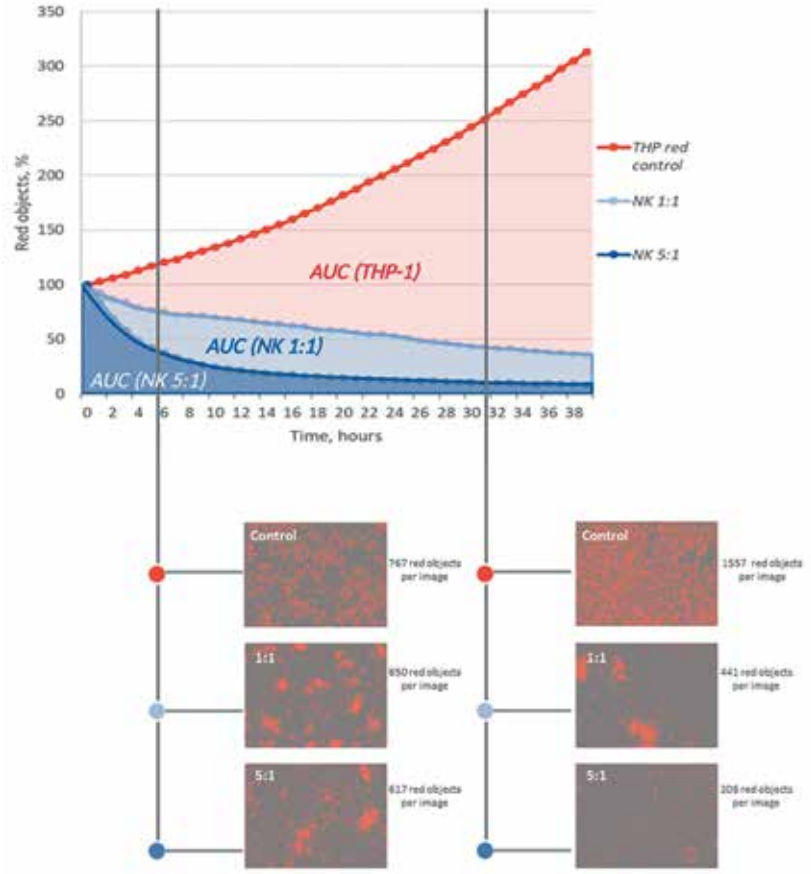
Таблица 1
Характеристики коммерческих моноклональных антител, использованных для анализа методом проточной цитометрии

Table 1
The characteristics of commercial monoclonal antibodies used for flow cytometry

Маркер Marker	Клон Clone	Компания-производитель Manufacturing company	Клеточная популяция Cell population
CD45	J33	Beckman Coulter, USA	Лейкоциты Leukocytes
7AAD	–	Miltenyi Biotec, Germany	Жизнеспособность Viability
CD14	RM052	Miltenyi Biotec, Germany	Моноциты Monocytes
CD16	3G8	Beckman Coulter, USA	НК-лимфоциты/нейтрофилы NK lymphocytes/neutrophils
CD56	NCAM16.2	Becton Dickinson, USA	НК-лимфоциты NK lymphocytes
CD19	J3-119	Miltenyi Biotec, Germany	В-лимфоциты B lymphocytes
CD3	REA613	Miltenyi Biotec, Germany	Т-лимфоциты T lymphocytes
CD4	M-T466	Miltenyi Biotec, Germany	Т-хелперы T helpers
CD8	SK1	Becton Dickinson, USA	Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes
TCRαβ	BW242/412	Miltenyi Biotec, Germany	TCRαβ Т-лимфоциты TCRαβ T lymphocytes
TCRγδ	REA591	Miltenyi Biotec, Germany	TCRγδ Т-лимфоциты TCRγδ T lymphocytes
CD197	REA108	Miltenyi Biotec, Germany	Наивный фенотип/фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T cell phenotype
CD45RA	T6D11	Becton Dickinson, USA	Наивный фенотип/фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T cell phenotype
NKG2A	REA110	Miltenyi Biotec, Germany	Субпопуляции НК-лимфоцитов NK lymphocyte subpopulations
NKG2C	REA205	Miltenyi Biotec, Germany	
HLA-DR	AC122	Miltenyi Biotec, Germany	
CD69	REA824	Miltenyi Biotec, Germany	
CD57	REA769	Miltenyi Biotec, Germany	

Рисунок 2
Репрезентативные примеры исходных изображений, полученных в различные временные точки с помощью системы IncuCyte S3, и результаты их анализа. Красный цвет соответствует контролю, а оттенки синего – разным концентрациям НК-клеток
График иллюстрирует временную динамику количества красных объектов, отражающую пролиферацию опухолевых клеток в присутствии (оттенки синего) и отсутствии (красный) НК БМКП

Figure 2
Representative examples of the initial images acquired at various time points using IncuCyte S3 system along with the corresponding analysis results are presented. Red color corresponds to the control, and shades of blue – to different concentrations of NK cells
The graph illustrates the temporal changes in the number of red objects, reflecting the tumor cell proliferation in the presence (blue) and absence (red) of the NK cell product



Если не указано обратное, все приведенные значения представлены в формате медианы с указанием максимума и минимума разброса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все полученные клеточные продукты успешно прошли контроль качества по заявленным критериям. Медиана содержания остаточной фидерной линии в финальном продукте составила 0,01% (0–0,1%).

В стартовой фракции мононуклеаров медиана содержания НК-клеток ($CD56^+CD3^-$) от всех лимфоцитов составила 14,5% (6,5–24,1%), медиана содержания Т-лимфоцитов ($CD56^-CD3^+$) – 71,7% (61,3–81,0%). Вариабельность процентного содержания НК-клеток во фракции мононуклеаров была значительно выше, чем Т-лимфоцитов (коэффициент вариации 12% и 49% соответственно).

В финале всех 7 процессов был получен клеточный продукт, значительно обогащенный НК-лимфоцитами: медиана содержания НК-клеток ($CD56^+CD3^-$) от всех лимфоцитов составила 88,% (61,4–97,1%).

На 9-й день экспансии медиана тотального количества НК-клеток составила 1,6E+09 (от 0,82E+09 до 2,6E+09), что соответствует увеличению от стартового количества в 284 (194–650) раза, а на 14-й день – 0,8E+09 (от 0,39E+09 до 1,63E+09) и в 200 (96,5–406,7) раз соответственно. Динамика экспансии НК-лимфоцитов представлена на *рисунке 3* с детализацией в *таблице 2*.

Интегральный анализ поверхностных маркеров НК-лимфоцитов указывает на смещение функционального фенотипа в сторону большего пролиферативного потенциала и активации: снижение экспрессии CD57 и повышение экспрессии NKG2A, NKG2C, HLA-DR и CD69 (*таблица 3*).

Остаточные популяции были представлены следовыми количествами В-лимфоцитов (0,15% (0,03–0,2%)), а также NKT-лимфоцитами ($CD56^+CD3^+$) (2,3% (0,5–20,8%)) и Т-лимфоцитами ($CD56^-CD3^+$) (8,9% (0,5–20,8%)). Следует отметить, что, несмотря на значительное снижение доли Т-лимфоцитов в процессе экспансии, их абсолютное количество в финальном продукте по сравнению со стартовой фракцией увеличилось в 3,7 (1,3–6,2) раза. Также

Рисунок 3
Изменение тотального количества НК-лимфоцитов в составе клеточного продукта
Данные представлены в виде наложения индивидуальной динамики каждого из 7 процессов и распределения массива данных в 2 временных точках (9-й и 14-й дни экспансии). Горизонтальной линией обозначены медианы

Figure 3
The changes in the total number of NK lymphocytes in the cellular product
The data are presented as an overlay of the individual curves for each of the 7 processes, along with the distribution of values at 2 time points (days 9 and 14 of expansion). The horizontal line indicates median values

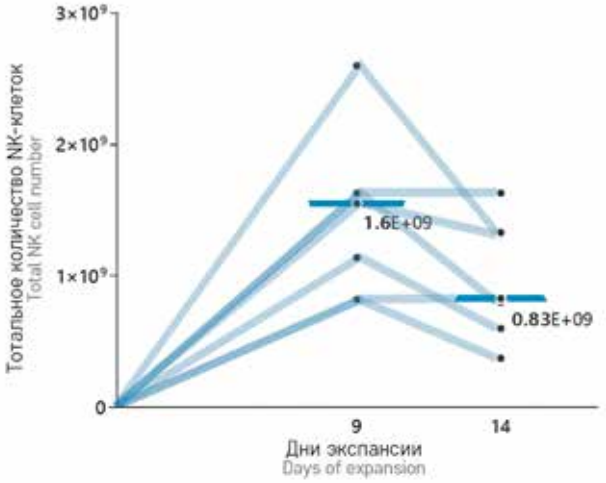


Таблица 2
Индивидуальные характеристики каждого процесса: субпопуляционный состав лимфоцитов стартовой и финальной фракции, а также параметры экспансии НК-лимфоцитов

Table 2
Individual characteristics of each process: lymphocyte subpopulations in the starting and final fractions, as well as the expansion parameters of NK lymphocytes

Номер процесса Process number	Стартовая фракция, % от лимфоцитов Starting fraction, % of lymphocytes				Финальная фракция, % от лимфоцитов Final fraction, % of lymphocytes				Тотальное количество НК-лимфоцитов в клеточном продукте Total number of NK lymphocytes in the cell product		Кратность увеличения количества НК-клеток относительно старта NK cell fold expansion compared to the starting fraction	
	$CD3^+$	$CD19^+$	$CD56^+CD3^-$	$CD56^+CD3^+$	$CD3^+$	$CD19^+$	$CD56^+CD3^-$	$CD56^+CD3^+$	9-й день Day 9	14-й день Day 14	9-й день Day 9	14-й день Day 14
1	73,6	9,7	7,2	6,1	16,6	0,03	62,3	20,8	1,6E+09	1,3E+09	194,0	163,5
2	59,3	4,8	22,3	11,0	2,4	0,1	95,8	1,1	1,6E+09	1,6E+09	408,4	406,7
3	72,7	12,7	10,1	1,7	20,1	0,2	77,4	2,3	1,1E+09	6,0E+08	283,9	150,0
4	81,0	4,8	6,5	6,7	27,0	0,2	61,4	11,3	1,6E+09	8,0E+08	408,2	200,0
5	69,8	10,3	14,5	3,3	8,9	0,2	88,1	2,9	8,2E+08	3,7E+08	204,0	93,5
6	59,2	12,3	24,1	2,2	4,0	0,15	95,9	0,5	8,2E+08	8,3E+08	205,5	207,5
7	61,8	6,7	20,6	9,8	1,9	0,03	97,1	0,96	2,6E+09	1,3E+09	650,0	332,5
Медиана Median	69,8	9,7	14,5	6,1	8,9	0,15	88,1	2,3	1,6E+09	0,83E+09	283,9	200,0

в процессе анализа была выявлена сильная положительная корреляция между процентным содержанием Т-клеток в стартовой фракции и в финальном продукте (R = 0,954; p = 0,0008). Субпопуляционный состав стартовой фракции и финального продукта представлен на *рисунке 4* с детализацией в *таблице 2*.

Состав Т-клеток, представленных в финальном продукте, был значительно изменен по сравнению с исходным: среди всех Т-клеток процент TCRαβ значимо уменьшился (с 96,4% до 57,5%; p = 0,0012), также изменилось соотношение $CD4^+/CD8^+$ (с 1,9 до 0,3). Фенотип остаточных Т-клеток был представлен более зрелыми высокодифференцированными стадиями по сравнению со стартовой фракцией: среди всех Т-клеток процент наивных ($CD45RA^+CD197^+$) уменьшился в среднем с 52% до 22%, а эффекторной популяции ($CD45RA^-CD197^-$) возрос с 20% до 64%. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов стартовой фракции и финального продукта представлен в *таблице 4*.

Также все полученные НК БМКП демонстрировали выраженную противоопухолевую активность в *in vitro* модели с клеточными линиями THP-1 и Jeko-1 (*рисунок 5*).

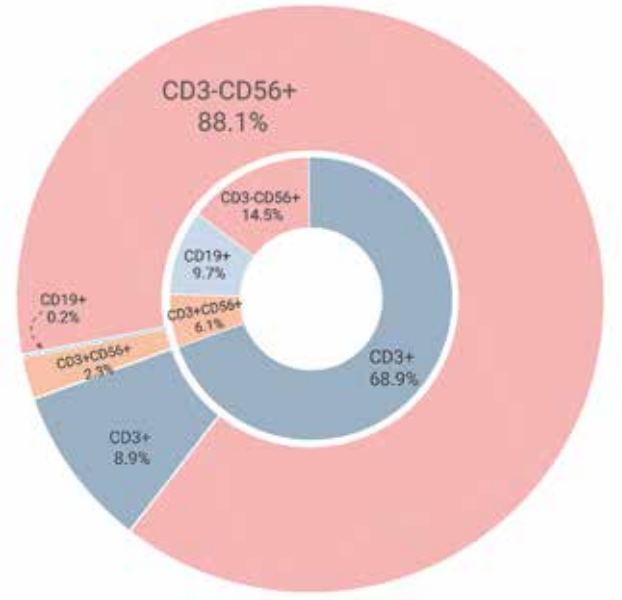
Таблица 3
Экспрессия маркеров НК-лимфоцитов в стартовой и финальной фракциях

Table 3
The expression of NK lymphocyte markers in the starting and final fractions

Маркер Marker	Старт, % от $CD3^-CD56^+$ Start, % of $CD3^-CD56^+$	Финал, % от $CD3^-CD56^+$ Final, % of $CD3^-CD56^+$
NKG2A	10,6 (0,2–13,2)	23,4 (18,7–28,1)
NKG2C	34,7 (28,2–53,0)	64,7 (48,6–87,2)
HLA-DR	3,7 (3,1–8,9)	52,5 (29,3–75,6)
CD69	1,9 (0,3–25,8)	26,8 (18,0–99,3)
CD57	69,8 (60,7–78,5)	5,7 (4,0–7,4)

Рисунок 4
Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов стартовой (внутренняя диаграмма) и финальной (наружная диаграмма) фракций
Диаграммы построены по значениям медиан (выведены на график), которые были рассчитаны на основе 7 процессов экспансии

Figure 4
A comparison of lymphocyte composition in the starting (inner chart) and final (outer chart) fractions
The donut chart depicts median values (displayed on the graph) derived from 7 independent expansion processes.



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

С учетом преимуществ и ограничений существующих методик *ex vivo* экспансии НК-лимфоцитов нами был выбран протокол с использованием фидерной линии K562 и фракции мононуклеаров периферической крови, не включающий этап деплеции $CD3^+$-лимфоцитов. Данный протокол с незначительными адаптациями на протяжении последних 10 лет широко используется по всему миру в клинических и доклинических исследованиях как самостоятельно, так и в качестве платформы для дальнейших генетических модификаций НК-клеток [24, 29, 35–38].

По результатам проведенного исследования была достигнута 100% выполнимость: 7 из 7 процессов завершились получением НК БМКП, который успешно прошел контроль качества и продемонстрировал высокую функциональную активность *in vitro*.

В финале всех 7 процессов были получены клеточные продукты, значительно обогащенные НК-лимфоцитами (медиана содержания популяции $CD3^-CD56^+$ составила 88,1%). Медиана

Таблица 4
Развернутый субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в стартовой и финальной фракциях

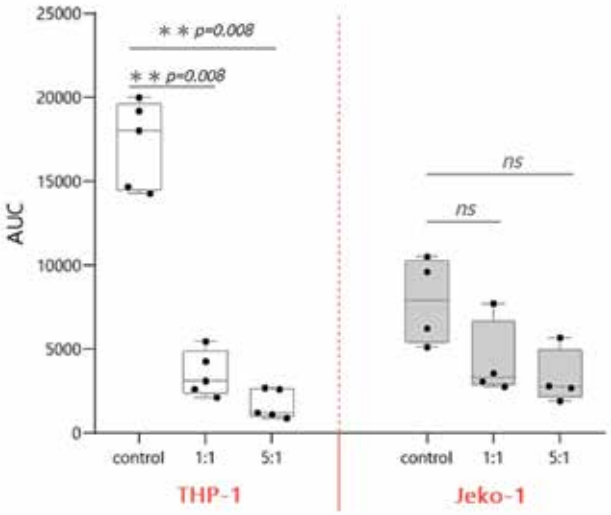
Table 4
Detailed T-lymphocyte composition in the starting and final cell product

Т-лимфоциты T lymphocytes	Старт, % от $CD3^+CD56^-$ Start, % of $CD3^+CD56^-$	Финал, % от $CD3^+CD56^-$ Final, % of $CD3^+CD56^-$
$CD4^+$-клетки $CD4^+$ cells	61,8 (59,1–67,7)	15,85 (6,7–33,6)
CD4 naïve	58,4 (37,4–62,1)	39,8 (14,3–70,1)
CD4 CM	22,0 (6,5–28,4)	11,7 (5,4–17,5)
CD4 EM	22,5 (8,7–35,6)	47,0 (15,0–71,3)
CD4 TEMRA	5,1 (0,8–6)	2,85 (1,0–5,5)
$CD8^+$-клетки $CD8^+$ cells	32,2 (25,4–37,2)	48,4 (41,8–74,2)
CD8 naïve	48,0 (24,5–65,8)	4,35 (1,4–6,8)
CD8 CM	3,1 (0,3–14,6)	0,9 (0,3–4,9)
CD8 EM	18,7 (6,5–23,5)	84,0 (44,0–92,6)
CD8 TEMRA	27,4 (18,7–59,5)	9,0 (5,8–52,4)
TCRαβ	96,4 (95,5 –98,3)	57,5 (41,3–76,4)
TCRγδ	3,6 (1,7–4,5)	50,4 (23,7–61,1)

Примечание. Значения приведены в виде медианы с разбросами по 7 процессам. Naive – наивные клетки ($CD197^+CD45RA^+$); CM (central memory) – центральные клетки памяти ($CD197^+CD45RA^-$); EM (effector memory) – эффекторные клетки памяти ($CD197^+CD45RA^-$); TEMRA (effector memory $CD45RA^+$) – CD45RA-положительные эффекторные клетки ($CD197^-CD45RA^+$).
Note. Values are given as a median with ranges calculated based on seven expansion processes. Naive – naïve cells ($CD197^+CD45RA^+$); CM – central memory cells ($CD197^+CD45RA^-$); EM – effector memory cells ($CD197^+CD45RA^-$); TEMRA – CD45RA-positive effector cells ($CD197^-CD45RA^+$).

Рисунок 5
Результаты анализа функциональной активности НК БМКП
Индивидуальные значения AUC, приведенные на графике, рассчитаны для 5 НК БМКП, соединенных с клеточными линиями THP-1 и Jeko-1 в 2 соотношениях (см. раздел «Материалы и методы»)

Figure 5
The results of the NK cellular product functional assay
Individual data points represent the AUC from 5 independent NK cellular products co-cultured with the THP-1 and Jeko-1 cell lines at 2 different effector-to-target ratios (see "Materials and Methods" for details)



тотального количества НК-лимфоцитов составила 0,8E+09 на 14-й день экспансии. Опираясь на данные завершенных клинических исследований, можно утверждать, что полученные нами количественные характеристики клеточного продукта достаточны для обеспечения педиатрическим пациентам медианной дозы 15E+06/кг (исходя из средней массы пациента 35 кг) [38–41].

Также анализ динамики экспансии указывает на возможность дальнейшей оптимизации протокола: во всех процессах максимальное тотальное количество НК-лимфоцитов наблюдалось на 9-е сутки культивирования, после чего их число постепенно снижалось (*рисунок 3*). Сокращение длительности процесса до 10 дней позволит не только увеличить выход таргетной популяции клеток, но и снизить стоимость производства за счет уменьшения расхода питательной среды, а также сократить время ожидания клеточного продукта в рамках клинического протокола.

Как уже было упомянуто, протокол экспансии с использованием в роли активатора живых фидерных клеток требует строгого контроля качества финального клеточного продукта. Традиционно для обеспечения безопасности используют воздействие высокими дозами γ-излучения, которые блокируют клеточный цикл и останавливают пролиферацию фидерных клеток [42]. Однако в результате значительного стрессового воздействия и длительной культивации с цитотоксическими лимфоцитами фидерные клетки могут терять линейные маркеры, что усложняет их детекцию методом проточной цитометрии. В целях повышения надежности детекции фидерная линия была дополнительно снабжена экспрессией GFP, который позволяет с высокой чувствительностью идентифицировать остаточную популяцию на проточном цитометре за счет интенсивного сигнала в канале FITC [34]. Измеренные описанным методом значения содержания остаточного фидера были значительно ниже установленного порога во всех 7 процессах (медиана 0,1% при пороговом значении 0,5% от всех живых клеток), что свидетельствует в пользу безопасности потенциального клинического применения полученного клеточного продукта.

На 14-й день медиана примеси Т-лимфоцитов составила 8,9%, что при средней дозе НК-лимфоцитов 20E+06/кг составляет соответственно 2E+06/кг. Согласно клиническим протоколам, такое значение несколько превышает рекомендуемые к $CD3^+$-деплеции дозы Т-клеток. Однако включение в производственный протокол НК БМКП этапа магнитной сепарации должно быть достаточно обосновано, поскольку увеличивает стоимость всего процесса и повышает риск контаминации за счет дополнительных манипуляций. Вместе с тем потенциальное присутствие в финальном клеточном продукте значимой примеси аллореактивных Т-лимфоцитов связано с риском развития реакции «трансплантат против хозяина», поэтому одной из важных задач нашего исследования была подробная характеристика остаточных Т-лимфоцитов.

Расширенный анализ фенотипа остаточных Т-клеток выявил преобладание зрелых высокодифференцированных стадий, а также статистически значимое снижение процента популяции TCRαβ среди всех Т-клеток (с 96,4% до 57,5%; p = 0,0012). Полученные данные могут не только свидетельствовать в пользу снижения аллореактивного потенциала примеси Т-клеток, но и указывать на возможный противовирусный эффект, что может явиться преимуществом для пациентов с высоким риском инфекционных осложнений в посттрансплантационном периоде.

Основной целью клинического применения инфузий активированных НК-лимфоцитов является профилактика рецидива, особенно для пациентов с рефрактерными формами ОМЛ [24, 38, 43]. В связи с этим важнейшим этапом валидации полученных НК БМКП было подтверждение их цитотоксической эффективности в отношении не только лимфоидных (Jeko-1), но и миелоидных (THP-1) бластных клеточных линий. Классические методики определения внутриклеточной экспрессии цитокинов и оценки уровня дегрануляции в присутствии опухо-

левой клеточной линии недостаточно информативны для НК-клеток, полученных путем 2-недельной экспансии, поскольку базовый уровень этих показателей достаточно высок у предварительно активированных клеток [44]. В связи с этим основным методом функциональной оценки полученного НК БМКП был выбран тест, отражающий способность НК-лимфоцитов напрямую элиминировать опухолевые клетки *in vitro*. Тест проводился на приборе прижизненной визуализации активности клеток IncuCyte S3, который позволяет также проследить временную динамику противоопухолевой активности цитотоксических лимфоцитов. Все исследованные НК БМКП подавляли пролиферацию бластных клеток, причем в отношении миелоидной клеточной линии THP-1 эффект был более выражен. Полученные результаты не могут быть напрямую экстраполированы на клинический потенциал клеточных продуктов и требуют дополнительного подтверждения в *in vivo* и *in vitro* моделях с расширением спектра мишеней и тестируемых соотношений.

Анализ фенотипа НК-лимфоцитов после экспансии выявил существенное повышение экспрессии маркеров активации CD69 и HLA-DR, что указывает на ярко выраженные цитотоксические свойства [45]. Вместе с тем снижение экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD57 может свидетельствовать о повышении пролиферативного потенциала и одновременном снижении цитотоксичности по антителозависимому пути [46]. Повышение экспрессии NKG2C связывают с увеличением доли обладающих противовирусной активностью НК-клеток памяти [47]. Одновременно повышение экспрессии ингибирующего рецептора NKG2A может повышать вероятность ухода бластных клеток из-под иммунологического контроля за счет гиперэкспрессии HLA-E [48, 49]. По совокупности представленных фенотипических характеристик сложно сделать однозначный вывод об изменении пролиферативных и цитотоксических свойств НК-лимфоцитов после экспансии, если интерпретировать результаты через призму знаний о нормальной физиологии НК-лимфоцитов в организме, что подчеркивает важность использования *in vitro* и *in vivo* моделей для оценки их истинных функциональных свойств.

Несмотря на признанную клиническую эффективность, применение данного вида клеточной терапии имеет целый ряд ограничений. В частности, короткое время персистенции НК-клеток делает их скорее альтернативой высокотоксичной химиотерапии, но не позволяет осуществлять долгосрочный контроль над опухолевым процессом. Также отсутствие этапа $CD3^+$-деплеции делает данный вид терапии строго персонализированным, что значительно увеличивает его стоимость и снижает доступность. Несмотря на указанные ограничения, мы рассматриваем настоящий протокол как платформу для разработки НК БМКП следующего поколения с использованием большого спектра генетических модификаций, направленных на придание им антиген-специфичности, способности к длительной персистенции и управляемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования был разработан и валидирован протокол производства НК БМКП. На основании данного протокола планируется проведение пилотного клинического исследования выполнимости и безопасности инфузий донорских НК-клеток для профилактики рецидива лейкоза после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ
Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID
Kulakovskaya E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9639-2779
Belchikov V.E. ORCID: https://orcid.org/0009-0001-7491-6906
Vedmedskaia V.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7247-4844
Fadeeva M.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6553-2505
Malakhova E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7334-0706
Musaeva E.Ya. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0581-9472
Lodoeva O.B. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2874-0014
Larin S.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2128-0078
Lukashina M.I. ORCID: https://orcid.org/0009-0005-0194-4200/
Kibardin A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5021-8065
Mollaev M.D. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0539-6393
Muzalevskii Ya.O. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3513-8299
Kazachenok A.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0497-9175
Melkova A.K. ORCID: https://orcid.org/0009-0000-3801-0931
Zavidnyi T.Yu. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4705-401X
Trakhtman P.E. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0231-1617
Shelikhova L.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0520-5630
Pershin D.E. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6148-7209
Maschan M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1735-0093

Литература / References

1. Румянцев А.Г. Перспективы таргетной терапии острого лейкоза у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 2: 62–74. [Rumyantsev A.G. Prospects of targeted therapy for pediatric acute leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2017; 2: 62–74. (In Russ.)].
2. Reinhardt D., Antoniou E., Waack K. Pediatric Acute myeloid leukemia – past, present, and future. JCM 2022; 11: 504. DOI: 10.3390/jcm11030504
3. Inaba H., Mullighan C.G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematol 2020; 105: 2524–39. DOI: 10.3324/haematol.2020.247031
4. Илюшина М.А., Шелихова Л.Н., Шашелева Д.А., Дунайкина М.А., Благов С.Л., Курникова Е.Е. и др. Опыт аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с химиорезистентным острым миелоидным лейкозом. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 14–25. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-14-24 [Ilyushina M.A., Shelikhova L.N., Shasheleva D.A., Dunaykina M.A., Blagov S.L., Kurnikova E.E. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes in pediatric patients with refractory acute myeloid leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 14–25. (In Russ.)].
5. Omar A.A., Basiouny L., Elnoby A.S., Zaki A., Abouzid M. St. Jude Total Therapy studies from I to XVII for childhood acute lymphoblastic leukemia: a brief review. J Egypt Natl Canc Inst 2022; 34: 25. DOI: 10.1186/s43046-022-00126-3
6. Styczyński J., Tridello G., Koster L., Iacobelli S., van Biezen A., van der Werf S., et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. Bone Marrow Transplant 2020; 55: 126–36. DOI: 10.1038/s41409-019-0624-z
7. Duell J., Lammers P.E., Djuretic I., Chunyk A.G., Alekar S., Jacobs I., et al. Bispecific antibodies in the treatment of hematologic malignancies. Clin Pharmacol Ther 2019; 106: 781–91. DOI: 10.1002/cpt.1396
8. Cao W., Ma S., Han L., Xing H., Li Y., Jiang Z., et al. Bispecific antibodies in immunotherapy for acute leukemia: latest updates from the 66th annual meeting of the American society of hematology, 2024. Front Oncol 2025; 15: 1566202. DOI: 10.3389/fonc.2025.1566202
9. Narayan R., Piérola A.A., Donnellan W.B., Yordi A.M., Abdul-Hay M., Platzbecker U., et al. First-in-human study of JNJ-67571244, a CD33 × CD3 bispecific antibody, in relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Transl Sci 2024; 17: e13742. DOI: 10.1111/cts.13742
10. Bonifant C.L., Tasian S.K. The future of cellular immunotherapy for childhood leukemia. Curr Opin Pediatr 2020; 32: 13–25. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000866
11. Aamir S., Anwar M.Y., Khalid F., Khan S.I., Ali M.A., Khattak Z.E. Systematic review and meta-analysis of CD19-Specific CAR-T cell therapy in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in the pediatric and young adult population: safety and efficacy outcomes. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2021; 21: e334–47. DOI: 10.1016/j.clml.2020.12.010
12. Nieto Y., Banerjee P., Kaur I., Basar R., Li Y., Daher M., et al. Allogeneic NK cells with a bispecific innate cell engager in refractory relapsed lymphoma: a phase 1 trial. Nat Med 2025. DOI: 10.1038/s41591-025-03640-8
13. Paul S., Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. Front Immunol 2017; 8: 1124. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01124
14. Yoon S.R., Kim T.-D., Choi I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. Exp Mol Med 2015; 47: e141. DOI: 10.1038/emm.2014.114
15. Roerden M., Spranger S. Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. Nat Rev Immunol 2025; 25: 353–69. DOI: 10.1038/s41577-024-01111-8
16. Zhou T., Curry C.V., Khanlari M., Shi M., Cui W., Peker D., et al. Genetics and pathologic landscape of lineage switch of acute leukemia during therapy. Blood Cancer J 2024; 14: 1–6. DOI: 10.1038/s41408-024-00983-2
17. Mushtaq M.U., Shahzad M., Shah A.Y., Chaudhary S.G., Zafar M.U., Anwar I., et al. Impact of natural killer cells on outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. Front Immunol 2022; 13: 1005031. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1005031
18. Maggs L., Kinsella F., Chan Y.L.T., Eldershaw S., Murray D., Nunnick J., et al. The number of CD56dim NK cells in the graft has a major impact on risk of disease relapse following allo-HSCT. Blood Adv 2017; 1: 1589–97. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017008631
19. Hadjis A.D., McCurdy S.R. The role and novel use of natural killer cells in graft-versus-leukemia reactions after allogeneic transplantation. Front Immunol 2024; 15: 1358668. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1358668
20. Glushkova S., Shelikhova L., Voronin K., Pershin D., Vedmedskaya V., Muzalevskii Y., et al. Impact of Natural Killer Cell-Associated Factors on Acute Leukemia Outcomes after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with αβ T Cell Depletion in a Pediatric Cohort. Transplant Cell Ther 2024; 30: 435.e1–12. DOI: 10.1016/j.jtct.2024.01.070
21. Passweg J.R., Tichelli A., Meyer-Monard S., Heim D., Stern M., Kühne T., et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. Leukemia 2004; 18: 1835–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403524
22. Shaffer B.C., Le Luduec J.-B., Forlenza C., Jakubowski A.A., Perales M.-A., Young J.W., et al. Phase II Study of haploidentical natural killer cell infusion for treatment of relapsed or persistent myeloid malignancies following allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2016; 22: 705–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.12.028
23. Çubukçu H.C., Mesutoğlu P.Y., Seval G.C., Beksaç M. *Ex vivo* expansion of natural killer cells for hematological cancer immunotherapy: a systematic review and meta-analysis. Clin Exp Med 2022; 23: 2503–33. DOI: 10.1007/s10238-022-00923-z
24. Ciurea S.O., Kongtim P., Srour S., Chen J., Soebbing D., Shpall E., et al. Results of a phase I trial with Haploidentical mbIL-21 *ex vivo* expanded

NK cells for patients with multiply relapsed and refractory AML. Am J Hematol 2024; 99: 890–9. DOI: 10.1002/ajh.27281
25. Basílio-Queirós D., Venturini L., Luther-Wolf S., Dammann E., Ganser A., Stadler M., et al. Adaptive NK cells undergo a dynamic modulation in response to human cytomegalovirus and recruit T cells in *in vitro* migration assays. Bone Marrow Transplant 2022; 57: 712–20. DOI: 10.1038/s41409-022-01603-y
26. Hammer Q., Rückert T., Borst E.M., Dunst J., Haubner A., Durek P., et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. Nat Immunol 2018; 19: 453–63. DOI: 10.1038/s41590-018-0082-6
27. Yu X.-X., Shang Q.-N., Liu X.-F., He M., Pei X.-Y., Mo X.-D., et al. Donor NKG2C homozygosity contributes to CMV clearance after haploidentical transplantation. JCI Insight 2022; 7 (3): e149120. DOI: 10.1172/jci.insight.149120
28. Ciurea S.O., Kongtim P., Soebbing D., Trikha P., Behbehani G., Rondon G., et al. Decrease post-transplant relapse using donor-derived expanded NK-cells. Leukemia 2022; 36: 155–64. DOI: 10.1038/s41375-021-01349-4
29. Shang Q.-N., Yu X.-X., Xu Z.-L., Chen Y.-H., Han T.-T., Zhang Y.-Y., et al. Expanded clinical-grade NK cells exhibit stronger effects than primary NK cells against HCMV infection. Cell Mol Immunol 2023; 20: 895–907. DOI: 10.1038/s41423-023-01046-5
30. Oyer J.L., Croom-Perez T.J., Hasan M.F., Rivera-Huertas J.A., Gitto S.B., Mucha J.M., et al. PM21-particle stimulation augmented with cytokines enhances NK cell expansion and confers memory-like characteristics with enhanced survival. Front Immunol 2024; 15: 1383281. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1383281
31. De Rham C., Ferrari-Lacraz S., Jendly S., Schneiter G., Dayer J.-M., Villard J. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. Arthritis Res Ther 2007; 9: R125. DOI: 10.1186/ar2336
32. Johnson C.D.L., Zale N.E., Frary E.D., Lomakin J.A. Feeder-cell-free and serum-free expansion of natural killer cells using cloudz microspheres, G-Rex6M, and human platelet lysate. Front Immunol 2022; 13: 803380. DOI: 10.3389/fimmu.2022.803380
33. 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; 13: 802906. DOI: 10.3389/fimmu.2022.802906
34. Lapteva N., Durett A.G., Sun J., Rollins L.A., Huye L.L., Fang J., et al. Large-scale *ex vivo* expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. Cytotherapy 2012; 14: 1131–43. DOI: 10.3109/14653249.2012.700767
35. Lapteva N., Szmania S.M., van Rhee F., Rooney C.M. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. Crit Rev Oncog 2014; 19: 121–32. DOI: 10.1615/critrevoncog.2014010931
36. Wang X., Byrne M.E., Liu C., Ma M.T., Liu D. Scalable process development of NK and CAR-NK expansion in a closed bioreactor. Front Immunol 2024; 15: 1412378. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1412378
37. Shman T.V., Vashkevich K.P., Migas A.A., Matveyenka M.A., Lasiukov Y.A., Mukhametshyna N.S., et al. Phenotypic and functional characterisation of locally produced natural killer cells *ex vivo* expanded with the K562-41BBL-mbIL21 cell line. Clin Exp Med 2023; 23: 2551–60. DOI: 10.1007/s10238-022-00974-2
38. Gómez García L.M., Escudero A., Mestre C., Fuster Soler J.L., Martínez A.P., Vagace Valero J.M., et al. Phase 2 Clinical trial of infusing haploidentical K562-mb15-41BBL-activated and expanded natural killer cells as consolidation therapy for pediatric acute myeloblastic leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2021; 21: 328–37.e1. DOI: 10.1016/j.clml.2021.01.013
39. Mestre Durán C., Leon Triana O., Pertiñez L., Bueno D., Sisinni L., Navarro Zapata A., et al. Phase I/II study on infusion of alloreactive or *ex vivo* IL-15 Stimulated natural killer cells after haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients with acute leukemia (PHINK): a study of the spanish hematopoietic stem cell transplantation group (GETH). Blood 2023; 142: 6888. DOI: 10.1182/blood-2023-189400
40. Nguyen R., Wu H., Pounds S., Inaba H., Ribeiro R.C., Cullins D., et al. A phase II clinical trial of adoptive transfer of haploidentical natural killer cells for consolidation therapy of pediatric acute myeloid leukemia. J Immunother Cancer 2019; 7: 81. DOI: 10.1186/s40425-019-0564-6
41. Ciurea S.O., Kongtim P., Soebbing D., Trikha P., Behbehani G., Rondon G., et al. Decrease post-transplant relapse using donor-derived expanded NK-cells. Leukemia 2022; 36: 155–64. DOI: 10.1038/s41375-021-01349-4
42. Kim G.H., Dang H.-N., Phan M.-T.T., Kweon S.H., Chun S., Cho D. X-ray as irradiation alternative for K562 feeder cell inactivation in human natural killer cell expansion. Anticancer Res 2018; 38: 5767–72. DOI: 10.21873/anticanres.12915
43. Rady M., Mostafa M., Dida G., Sabet F., Abou-Aisha K., Watzl C. Adoptive NK cell therapy in AML: progress and challenges. Clin Exp Med 2025; 25: 41. DOI: 10.1007/s10238-025-01559-5
44. Puig-Gámez M., Van Attekum M., Theis T., Dick A., Park J.E. Transcriptional signature of rapidly responding NK cells reveals S1P5 and CXCR4 as anti-tumor response disruptors. Sci Rep 2025; 15: 10769. DOI: 10.1038/s41598-025-95211-7
45. Evans J.H., Horowitz A., Mehrabi M., Wise E.L., Pease J.E., Riley E.M., et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. Eur J Immunol 2011; 41: 1924–33. DOI: 10.1002/eji.201041180
46. Lopez-Vergès S., Milush J.M., Pandey S., York V.A., Arakawa-Hoyt J., Pircher H., et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16^{+} NK-cell subset. Blood 2010; 116: 3865–74. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282301
47. Capuano C., Pighi C., Battella S., Santoni A., Palmieri G., Galandrini R. Memory NK Cell features exploitable in anticancer immunotherapy. J Immunol Res 2019; 2019: 8795673. DOI: 10.1155/2019/8795673
48. Wang X., Xiong H., Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases. Front Immunol 2022; 13: 960852. DOI: 10.3389/fimmu.2022.960852
49. Li Y., Li Z., Tang Y., Zhuang X., Feng W., Boor P.P.C., et al. Unlocking the therapeutic potential of the NKG2A-HLA-E immune checkpoint pathway in T cells and NK cells for cancer immunotherapy. J Immunother Cancer 2024; 12: e009934. DOI: 10.1136/jitc-2024-009934