



# Центр детской онкологии, гематологии и иммунологии

Получение фидерных генно-инженерных  
клеточных линий для экспансии ЕК-клеток  
*in vitro* с целью их применения в  
адаптивной иммунотерапии опухолевых  
заболеваний

Докладчик:

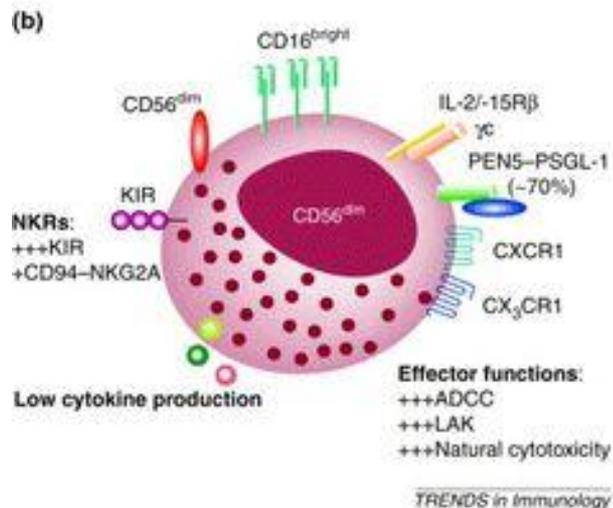
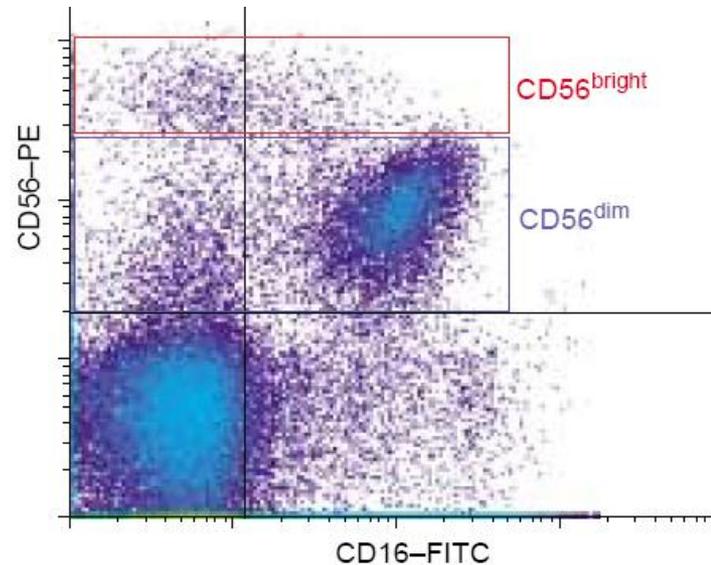
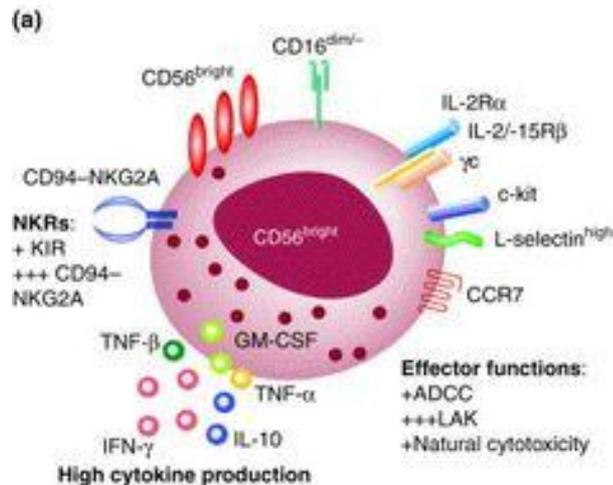
Александр Мигас

**Минск 2017**

# ЕК-клетки

- Описаны впервые в середине 1970-х как популяция лимфоцитов, способная лизировать аллогенные опухолевые клетки без предварительной сенсibilизации.
- 1986 год – Льюис Ланьер разделил на субпопуляции.
- Фенотип: CD3-, CD56+ или CD16+, NKp46+
- Обладают противоопухолевой (саркомы, миеломы, карциномы, лимфомы и лейкозы) и противовирусной (CMV, HSV, RSV...) активностью, при аллогенной трансплантации КМ предотвращают развитие РТПХ, снижают вероятность рецидивов, участвуют в регуляции иммунного ответа (продукция цитокинов).
- Цитотоксическая активность регулируется балансом активаторных и ингибиторных сигналов: отсутствие экспрессии молекул МНС первого класса, экспрессия стресс-лигандов, связывание FcγRIII с Fc-фрагментом IgG.

# Субпопуляции ЕК-клеток



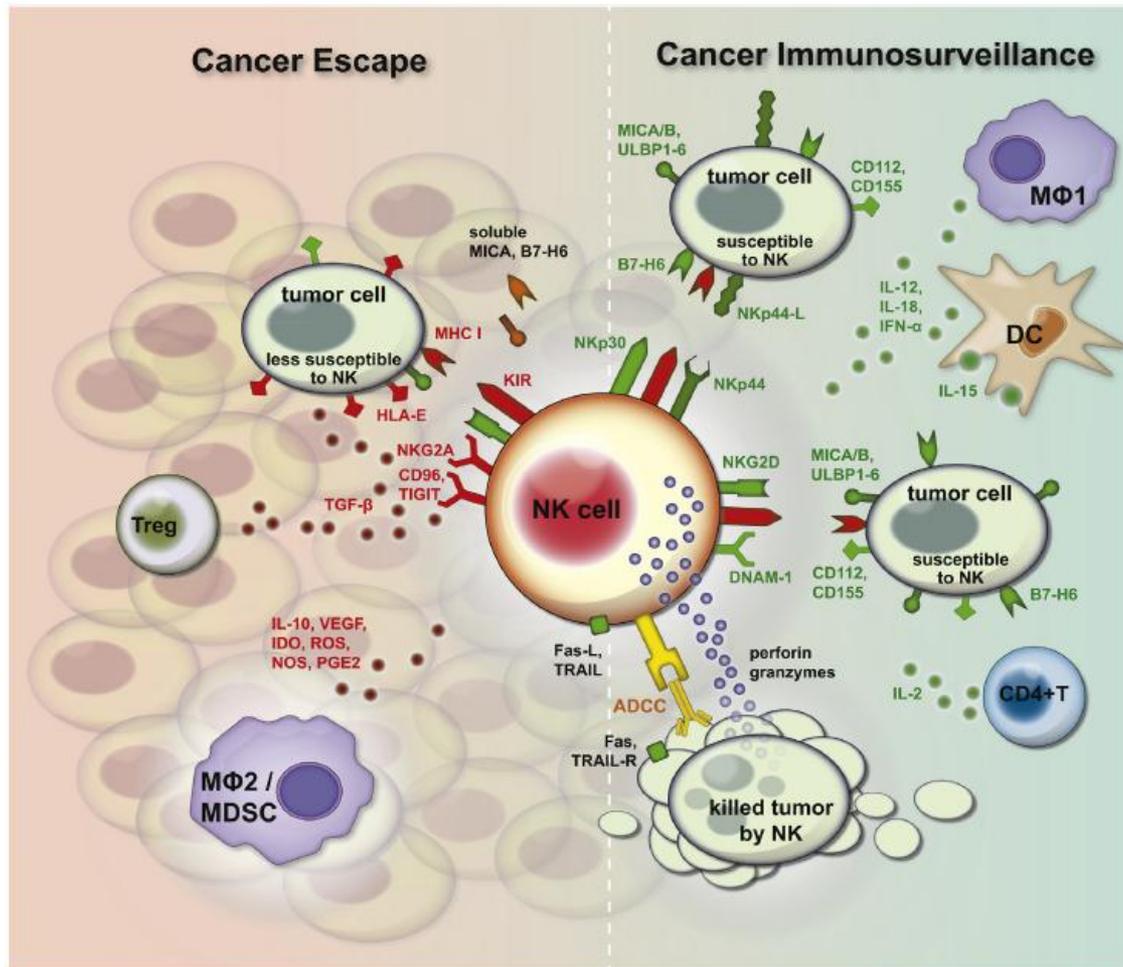
## Распределение:

ПК- основная популяция CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> (90%);  
вторичные лимфоидные органы -  
CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup>.

## Функции:

- CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> – продукция цитокинов, регуляция иммунного ответа;
- CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> – цитотоксическая активность .

# Взаимодействие ЕК и опухолевых клеток



ЕК-клетки взаимодействуют с опухолевыми клетками посредством активирующих(зеленые) и ингибиторных (красные) рецепторов, лигандов и растворимых факторов. При благоприятных обстоятельствах ДК и CD4+ Т-клетки стимулируют цитотоксическую активность ЕК продуцируя (ИЛ-15, ИЛ-18, IFN- $\alpha$ , ИЛ-2).

Механизмы избегания:

- Преобладание ингибиторных сигналов на поверхности опухолевых клеток;
- Продукция Трег-клетками, макрофагами типа 2 иммуносупрессивных факторов (TGF- $\beta$ , IL-10, PGE2, VEGF, NOS, ROS );
- Растворимые варианты активационных лигандов блокируют активационные рецепторы ЕК-клеток.

**Варианты  
использования  
ЕК-клеток в  
противоопухолевой  
иммунотерапии**

# ЕК-клетки в противоопухолевой иммунотерапии (*ограничения*)

Одним из лимитирующих факторов для проведения адаптивной иммунотерапии с использованием ЕК – клеток является получение необходимого количества клеточного продукта (небольшое кол-во в ПК, низкая эффективность экспансии *ex vivo*, ограниченный период циркуляции *in vivo*). Одно введение требует  $3 \times 10^6 - 2 \times 10^9$ /кг ЕК - клеток (в норме содержание  $0,5 - 4,5 \times 10^5$  клеток на мл ПК)

## **Способы получения клеточного продукта:**

1. Получение ЕК-клеток иммуномагнитной селекцией из ПК донора (пациента) - (CliniMax - 20 000\$ 1 сет)
2. Экспансия ЕК – клеток с использованием рекомбинантных цитокинов (в основном ИЛ-2 и ИЛ-15) – низкая эффективность, слабый пролиферативный потенциал
3. Экспансия ЕК – клеток с использованием фидерных клеток (K562-mbIL15-41BBL, K562-mbIL21-41BBL, EBV-TM-LCL)

# Клинические испытания с использованием адаптивного переноса ЕК-клеток. Оценка эффективности

Method	Patient population	Total number of clinical trials (number of active trials)	Comments
<i>Non-expanded NK cells</i>			
Autologous NK cells+IL-2	Melanoma, RCC, lung cancer and nasopharyngeal cancer	3 (1)	–
Autologous NK cells+IL-15	Neuroblastoma, sarcoma, Wilms tumour and rhabdomyosarcoma	1 (1)	Intended to more specifically bolster NK cell antitumour activity than IL-2
Allogeneic NK cells+IL-2	AML, multiple myeloma, myelodysplastic syndromes, lymphoma, ovarian carcinoma, melanoma, neuroblastoma, Ewing sarcoma, breast cancer and Fallopian tube cancer	55 (29)	Most data published on adoptive NK cell therapy are from these studies
Allogeneic NK cells+IL-15	AML and myelodysplastic syndromes	2 (1)	Intended to more specifically bolster NK cell antitumour activity than IL-2
<i>Expanded NK cells</i>			
Autologous NK cells	CLL, RCC, lung cancer, multiple myeloma, sarcoma, colon cancer, melanoma, neuroblastoma, prostate cancer, ALL and pancreatic cancer	7 (6)	Various expansion methods used, including EBV-LCL and membrane-bound cytokine or 4-1BBL feeder cells; some studies use IL-2 post NK cell infusion
Allogeneic NK cells	AML, myelodysplastic syndromes, T cell lymphoma and multiple myeloma	11 (8)	Various expansion methods used, including EBV-LCL and membrane-bound cytokine or 4-1BBL feeder cells; some studies use IL-2 post NK cell infusion
<i>Genetically manipulated NK cells</i>			
CD19 CAR mRNA (expanded NK cells)	BCL	2 (2)	Designed to redirect tumour targeting. Haploidentical NK cells expanded with K562 membrane-bound IL-15 or 4-1BBL feeder cells; in Phase II clinical trials
<i>NK cell lines</i>			
NK-92	AML, multiple myeloma and lymphoma	2 (2)	Off-the-shelf NK cells; in dose-escalating Phase I clinical trials

Childs, R., Carlsten, M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. Nature Reviews Drug Discovery (2015)

# Варианты экспансии и эффективность

	Starting material	Initial cell number	Medium	Stimulators* Feeder cells	Culture instrument	Culture time/ acquired cell number	Fold proliferation	Purity	Cytotoxicity	Phenotype, cytokine production	References**
Cord blood-derived NK cells	CD34 <sup>+</sup> cell from cord blood (CliniMACS)	(0.89–6.34) ×10 <sup>6</sup>	Glycostem Basal Growth Medium +10% HS	SCF, IL-7, IL-15, IL-2, Flt3L, TPO, G-CSF, IL-6, LMWH	Vuelife™ bags, WAVE Bioreactor System 2/10, BIOSTATH CultiBag RM system	6 weeks (1.6–3.7) ×10 <sup>9</sup>	1435–2657	>90%	K562 (>40%, 10:1)	CD56 <sup>+</sup> , CD3 <sup>-</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCRs <sup>+</sup> , CD161 <sup>+</sup> , CD314 <sup>+</sup> , CD244 <sup>+</sup>	[155]
	CD34 <sup>+</sup> cell from cord blood (CliniMACS)	(0.84–2.50) ×10 <sup>6</sup>	Glycostem Basal Growth Medium	SCF, TPO, IL-7, Flt3L, IL-15, IL-2, G-CSF, GM-CSF, IL-6, LIF, MIP-1 $\alpha$	24-well tissue culture plates	14–35 days (1.9–7.8) ×10 <sup>9</sup>	~10 <sup>4</sup> (freshly UCB); ~10 <sup>3</sup> (frozen UCB)	>95%	K562, Lama, Kasumi, BLM, nd FM3 (>75%) KG1a (~30%) (18 h 1:1)	CD56 <sup>+</sup> , CD3 <sup>-</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCRs <sup>+</sup> , CD107 <sup>+</sup> , 2B4 <sup>+</sup> , CD161 <sup>+</sup> , IFN- $\gamma$	[154]
Stem cell/iPSC-derived NK cells	CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> cells (H9 hESC line)	—	RPMI 1640+15% defined fetal bovine serum; DMEM/Ham F12+20% heat-inactivated human serum AB	IL-3, IL-15, IL-7, SCF and Flt3L; Feeder cells: M210-B4; AFT024	—	30–35 days	~100	>37.5%	K562, MCF7, PC3 (55%–80%), NTERA2, and U87 (20%–30%)	CD56 <sup>+</sup> , CD45 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup> , CD94 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NKp46 <sup>+</sup> , CD158a <sup>+</sup> , CD158b <sup>+</sup> , IFN- $\gamma$	[159,162,163]
	BM CD34 <sup>+</sup>	—	Dulbecco's medium supplemented with 12.5% fetal calf serum; 12.5% horse serum	IL-2; Feeder cells: stromal cells from irradiated BMMNC	—	—	~690	75%	K562 (80%, 6.6:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD2 <sup>+</sup> , CD7 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup>	[157]
PBMCs	CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> cells from PBMCs (CliniMACS)	(0.40±0.16) ×10 <sup>8</sup>	CellGro SCGM serum-free Medium, 5% AB human serum	IL-2, IL-15, anti-CD3 monoclonal antibody (MAb) OKT3	Baxter LifeCell culture bags	19 days (85.5±17.2) ×10 <sup>8</sup>	268.3±66.8	100%	K562 (>60%, 10:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCRs <sup>+</sup> , DNAM-1	[166]

Starting material	Initial cell number	Medium	Stimulators* Feeder cells	Culture instrument	Culture time/ acquired cell number	Fold proliferation	Purity	Cytotoxicity	Phenotype, cytokine production	References**
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> cells from PBMCs	3.0×10 <sup>6</sup>	SCGM Medium and 10% fetal bovine serum	IL-2; Feeder cells: K562-mb15-41BBL	VueLife bag system	7 days	90.5 (33–141)	83.1% (72.9%–85.9%)	K562, HL-60, KG1, and U937 (>40%, 4:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCRs <sup>+</sup>	[165]
CD56 <sup>+</sup> cells from PBMCs	(9.5–85.8) × 10 <sup>6</sup>	Alpha-MEM, 20% fetal bovine serum	IL-15, HC	—	20–23 days	23 (3.2–131.3)	97.9% (82.7%–99.6%)	K562, (23.2%, 7.0–54.7%, 1:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCRs <sup>+</sup>	[196]
CD56 <sup>+</sup> cells from PBMCs (CliniMACS)	2.0×10 <sup>8</sup>	X-VIVO 20 10% heat inactivated human AB serum	IL-2; Feeder cells: EBV-TM-LCL cells	Flasks and bags	21 days 3×10 <sup>10</sup>	490±260	84.3%±7.8%	RCC (27.6±9.3%, 1:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD244 <sup>+</sup> , CD48 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> sFasL, IFN-γ, GM-CSF, TNF-α, MIP-1α, MIP-1β	[164]
PBMCs	2×10 <sup>6</sup> NK cells	SCGM Medium and 10% fetal bovine serum	IL-2; Feeder cells: K562-mb15-41BBL	G-Rex100 flasks	8–10 days	209 (38–338)	61% (54%–70%)	K562, U266 and Raji (>40%, 5:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup>	[197]
PBMCs	—	Serum-free medium and 10% heat-inactivated human plasma	rhIL-2; OK432; anti-CD16	Cell-culture bag	21 days	637–5712	78.9%±11.6%	K562, Raji and Daudi (>20%, 3:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD158a <sup>+</sup> , CD158b1/b2 <sup>+</sup> , CD159a <sup>+</sup> , CD69 <sup>+</sup> , NKp30 <sup>+</sup> , NKp44 <sup>+</sup> , NKp46 <sup>+</sup> , IFN-γ, TNF-α	[198]
PBMC	1.5×10 <sup>6</sup>	cRPMI	IL-2; Feeder cells: K562-mbIL15-41BBL cells	T-25 or T-75 culture flasks	14 days	165 (4–567)	45.6% (7.4%–76.4%)	K562, MCF-7, LNCaP, DU145, PC-3	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCRs <sup>+</sup>	[199]
PBMCs	(4.6–9.7) × 10 <sup>8</sup>	CellGro SCGM serum-free medium 5% human serum	IL-2	Wave Bioreactor System 2/10	21 days (9.8×10 <sup>9</sup> )	Mean 77-fold	Mean 37.5%	K562 (>25%, 10:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD244 <sup>+</sup> , CD11a <sup>+</sup> , CD69 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup> , NCR <sup>+</sup>	[200]

	Starting material	Initial cell number	Medium	Stimulators* Feeder cells	Culture instrument	Culture time/ acquired cell number	Fold proliferation	Purity	Cytotoxicity	Phenotype, cytokine production	References**
	CD3-depleted PBMCs	10 <sup>7</sup> CD3-depleted cells	AIMV media 10% hu AB serum	IL-2; Feeder cells: OKT3-loaded autologous PBMC	Cell-culture bags	21 days (4.70±2.10) × 10 <sup>10</sup>	—	≥93%	888 (82±12%, 10:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup> , NKG2D <sup>+</sup>	<sup>176</sup>
NK cell lines	NK-92	(2.5×10 <sup>5</sup> /mL) × 25 mL/bag	X-Vivo 10 serum-free media amino acids and 2.5% human AB plasma	IL-2 (500 IU/ml)	1 l Vuelife culture bag	15–17 days >1×10 <sup>9</sup> /bag	>200	≥80% (viability)	K562 (72%); Raji (58%) (10:1)	CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , IL-6, IL-8, IL-10	[170,171]
		1×10 <sup>7</sup> /bioreactor	Optimized clinical-grade media	IL-2 (100~500 IU/ml)	Controlled stirred bioreactor	11–16 days >10 <sup>10</sup> /bioreactor	>1000	>95% (viability)	Highly lytic to leukemia, lymphoma, malignant melanoma, prostate cancer, squamous cell carcinoma, breast cancer	Positive: CD56, CD2, CD7, C11a, CD28, CD45, CD54 Negative: CD1, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD20, CD23, CD34, HLA-DR	[131]
	NKG	(1×10 <sup>5</sup> /ml) × 200 ml/bag	α-MEM medium 10% fetal bovine serum + 10% horse serum	IL-2 (100 IU/ml)	WAVE Bioreactor	12–14 days >10 <sup>10</sup> /bag	>1000	>90% (viability)	K562 (>50%), Ho-8910 (>60%), Daudi (>70%), LoVo (>35%) (10:1)	CD56 <sup>+</sup> , CD16 <sup>-</sup> , CD27 <sup>-</sup> , CD3 <sup>-</sup> , αβTCR <sup>-</sup> , γδTCR <sup>-</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>-</sup> , CD19 <sup>-</sup> , CD161 <sup>-</sup> , CD45 <sup>+</sup> , CXCR4 <sup>+</sup> , CCR7 <sup>+</sup> , CXCR1 <sup>-</sup> , CX3CR1 <sup>-</sup> ; IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10	[127]

Cheng, M., et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cellular and Molecular Immunology(2013)

# Membrane-Bound IL-21 Promotes Sustained *Ex Vivo* Proliferation of Human Natural Killer Cells

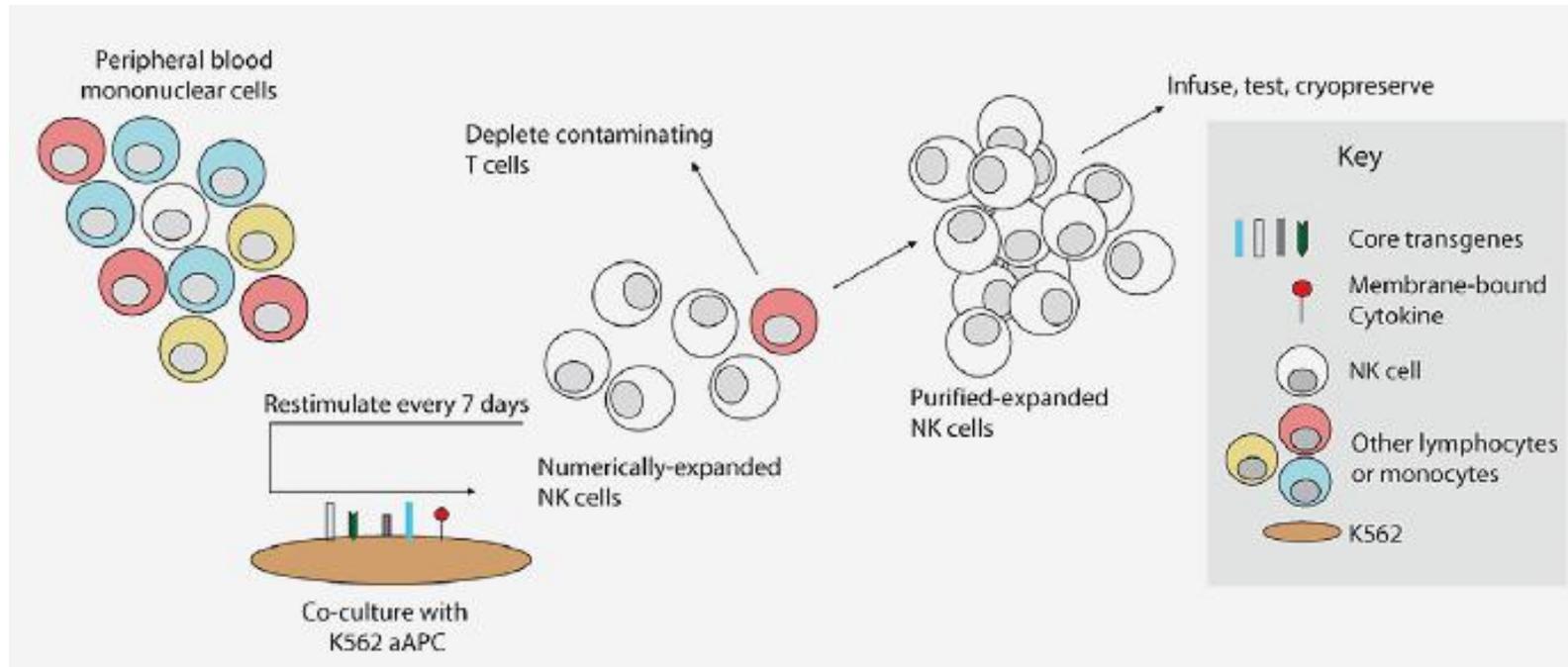
Cecele J. Denman<sup>1</sup>, Vladimir V. Senyukov<sup>1</sup>, Srinivas S. Somanchi<sup>1</sup>, Prasad V. Phatarpekar<sup>1,2</sup>, Lisa M. Kopp<sup>1</sup>, Jennifer L. Johnson<sup>1</sup>, Harjeet Singh<sup>1</sup>, Lenka Hurton<sup>1,2</sup>, Sourindra N. Maiti<sup>1</sup>, M. Helen Huls<sup>1</sup>, Richard E. Champlin<sup>3</sup>, Laurence J. N. Cooper<sup>1,2</sup>, Dean A. Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Division of Pediatrics, MD Anderson Cancer Center, The University of Texas, Houston, Texas, United States of America, <sup>2</sup> Graduate School of Biomedical Sciences, Health Science Center, The University of Texas, Houston, Texas, United States of America, <sup>3</sup> Department of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy, MD Anderson Cancer Center, The University of Texas, Houston, Texas, United States of America

## Abstract

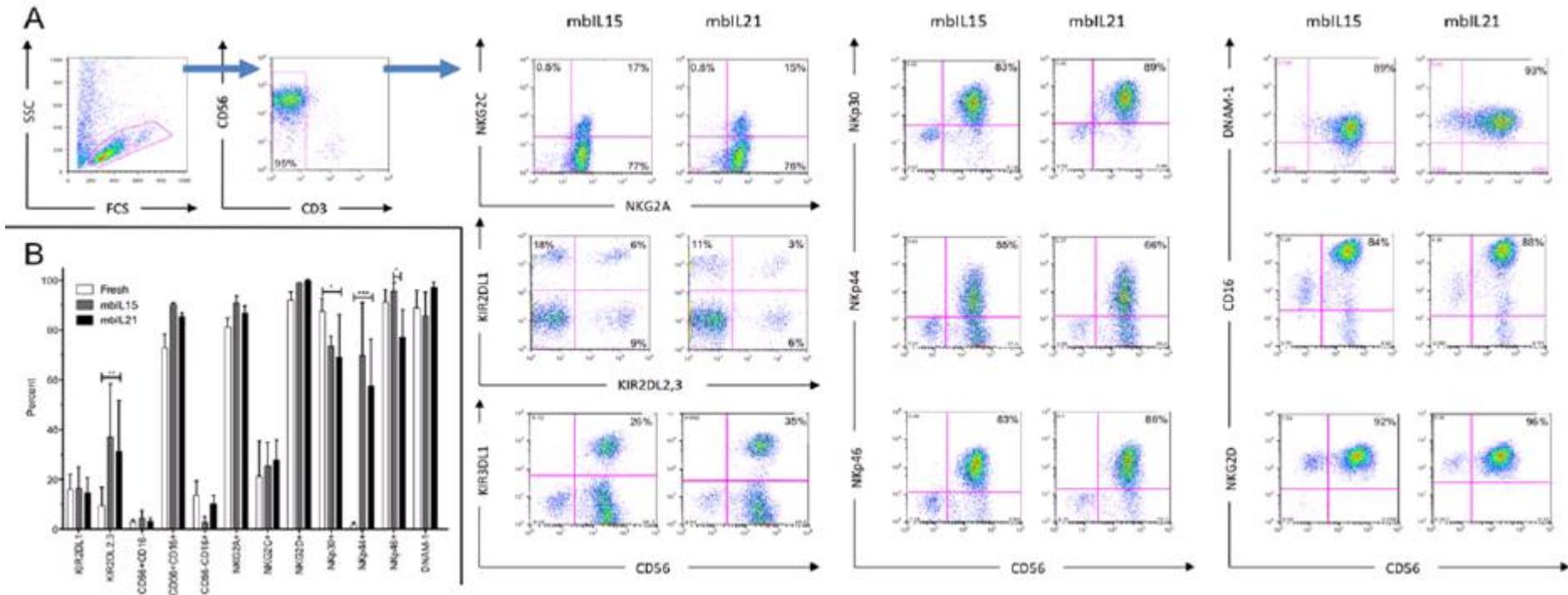
NK cells have therapeutic potential for a wide variety of human malignancies. However, because NK cells expand poorly *in vitro*, have limited life spans *in vivo*, and represent a small fraction of peripheral white blood cells, obtaining sufficient cell numbers is the major obstacle for NK-cell immunotherapy. Genetically-engineered artificial antigen-presenting cells (aAPCs) expressing membrane-bound IL-15 (mbIL15) have been used to propagate clinical-grade NK cells for human trials of adoptive immunotherapy, but *ex vivo* proliferation has been limited by telomere shortening. We developed K562-based aAPCs with membrane-bound IL-21 (mbIL21) and assessed their ability to support human NK-cell proliferation. In contrast to mbIL15, mbIL21-expressing aAPCs promoted log-phase NK cell expansion without evidence of senescence for up to 6 weeks of culture. By day 21, parallel expansion of NK cells from 22 donors demonstrated a mean 47,967-fold expansion (median 31,747) when co-cultured with aAPCs expressing mbIL21 compared to 825-fold expansion (median 325) with mbIL15. Despite the significant increase in proliferation, mbIL21-expanded NK cells also showed a significant increase in telomere length compared to freshly obtained NK cells, suggesting a possible mechanism for their sustained proliferation. NK cells expanded with mbIL21 were similar in phenotype and cytotoxicity to those expanded with mbIL15, with retained donor KIR repertoires and high expression of NCRs, CD16, and NKG2D, but had superior cytokine secretion. The mbIL21-expanded NK cells showed increased transcription of the activating receptor CD160, but otherwise had remarkably similar mRNA expression profiles of the 96 genes assessed. mbIL21-expanded NK cells had significant cytotoxicity against all tumor cell lines tested, retained responsiveness to inhibitory KIR ligands, and demonstrated enhanced killing via antibody-dependent cell cytotoxicity. Thus, aAPCs expressing mbIL21 promote improved proliferation of human NK cells with longer telomeres and less senescence, supporting their clinical use in propagating NK cells for adoptive immunotherapy.

# Экспансия с использованием фидерных клеточных линий на основе K562



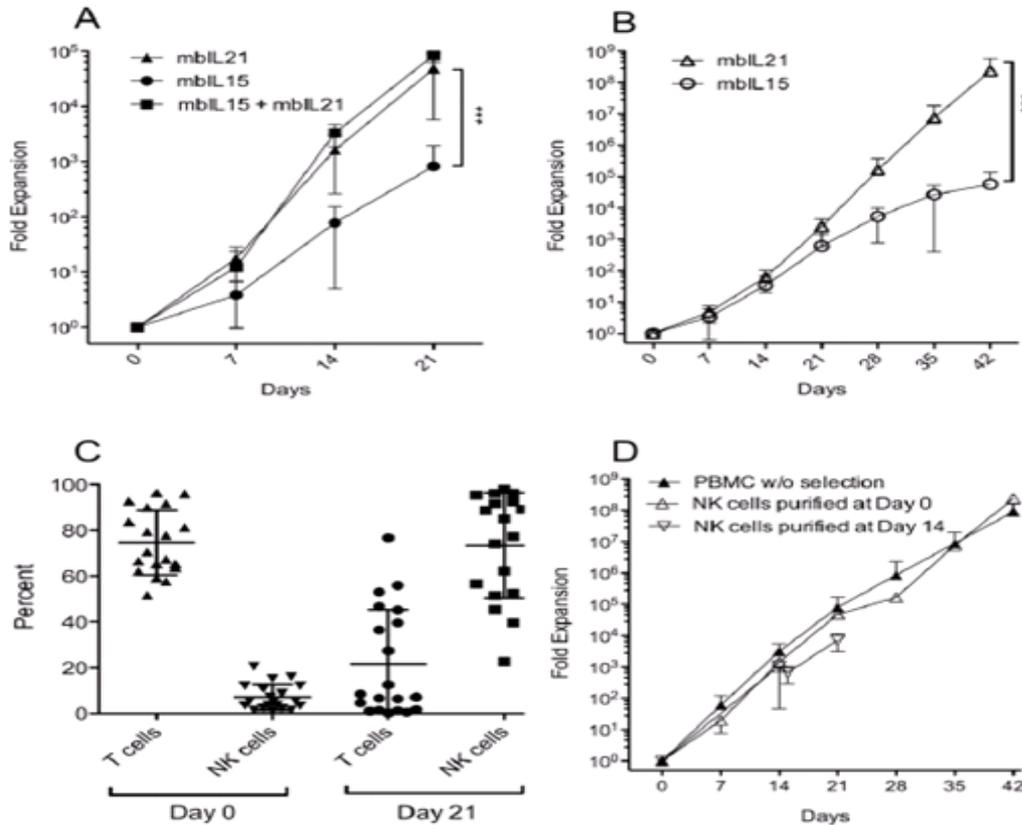
ЕК-клетки, подвергшиеся экспансии и активации *ex vivo* с использованием фидерных клеток характеризуются повышенной экспрессией активаторных рецепторов (DNAM-1, NKp46, NKp44, NKp30 and NKG2D). Повышенный уровень экспрессии активационных молекул, по мнению некоторых авторов, позволяет проявлять им цитотоксическую активность по отношению к клеткам мишеням независимо от репертуара лигандов KIR.

# Фенотип экспансированных ЕК-клеток



ЕК-клетки, выделенные из популяции мононуклеаров ПК стимулировались с использованием АПК, несущих на своей поверхности рекомбинантный, связанный с мембраной вариант ИЛ-15, либо ИЛ-21 (помимо общих дополнительных активаторных лигандов).

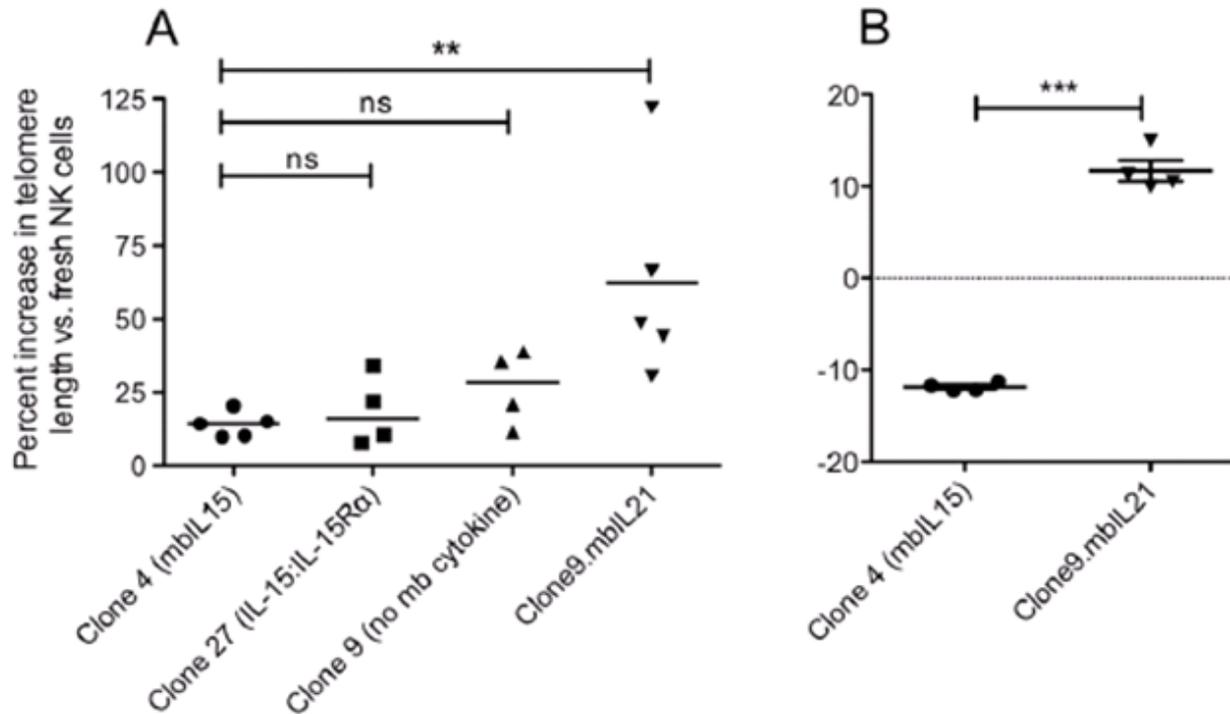
# Экспансия/чистота



Степень экспансии ЕК-клеток донора с использованием искусственных АПК при продолжительности стимуляции 21 день (A) и 42 дня (B).

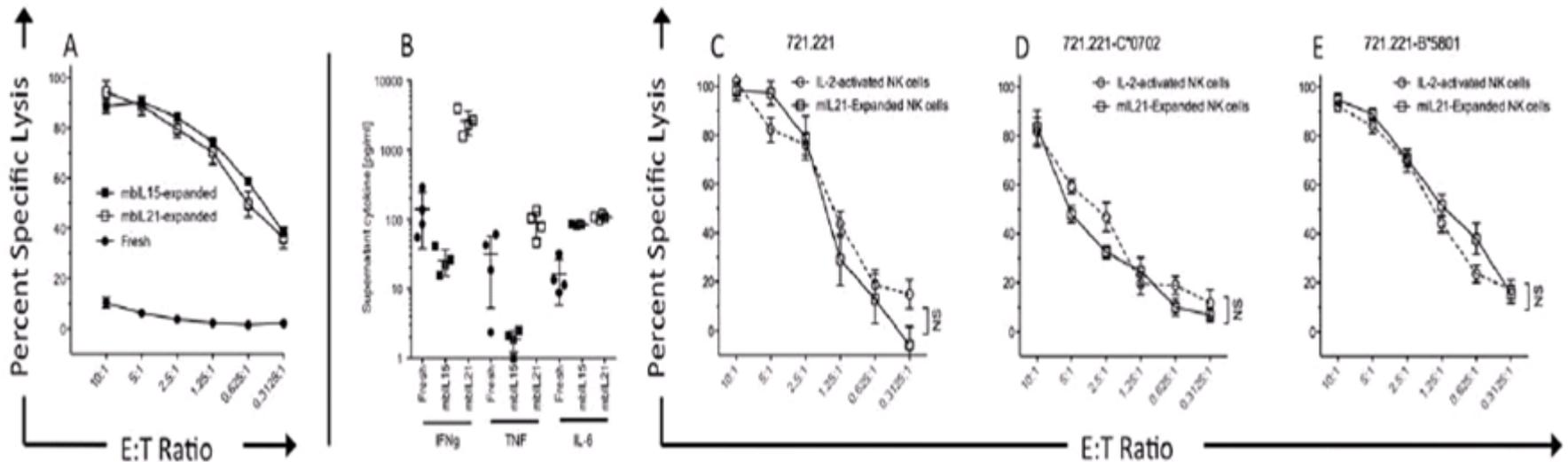
Чистота полученной в результате экспансии популяции ЕК-клеток при использовании моноклеаров ПК донора в качестве исходного материала (C). Степень экспансии ЕК-клеток донора при использовании различных вариантов исходного материала (D).

# Длина теломер



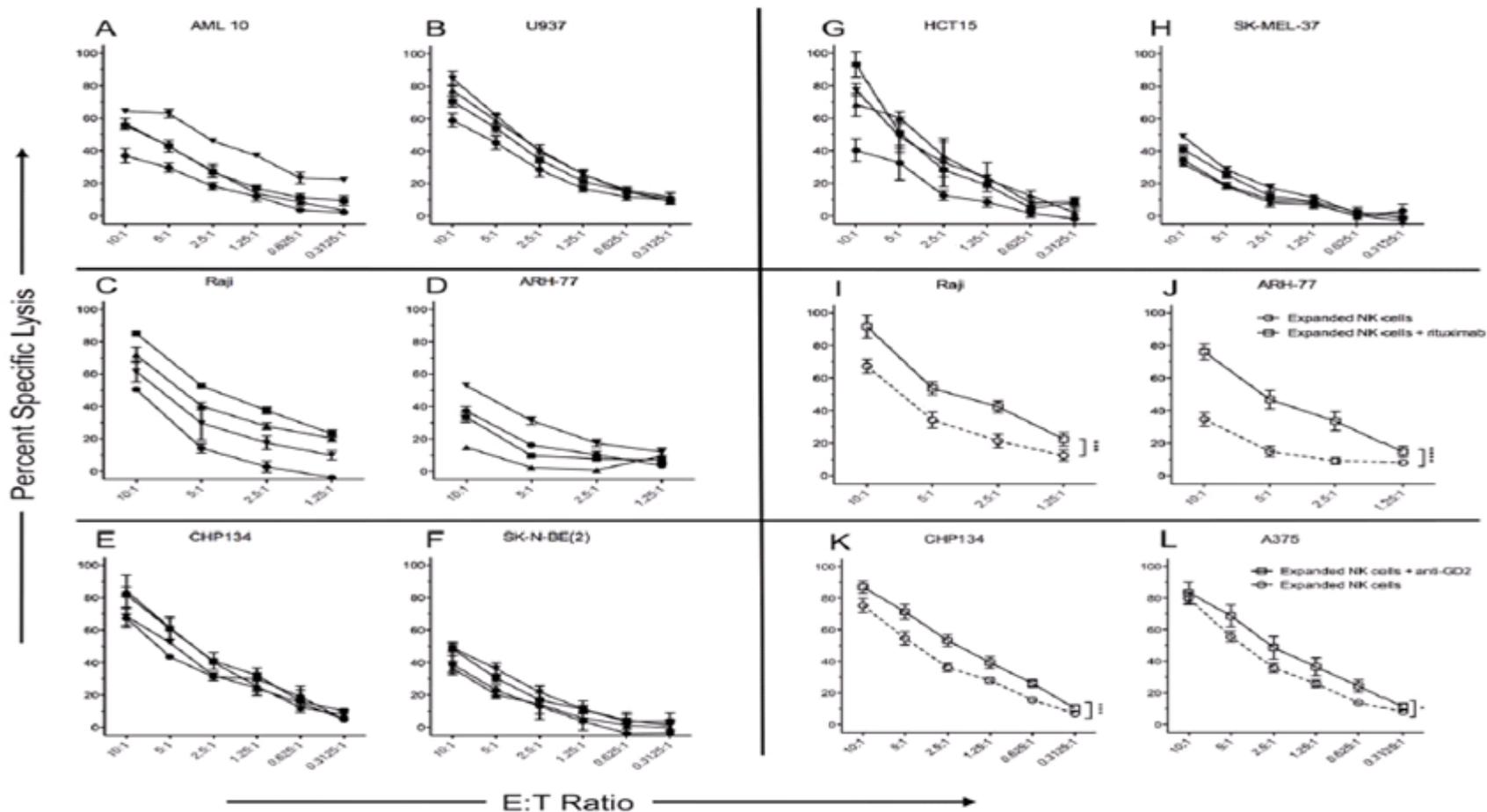
Длина теломерных концов в популяции ЕК-клеток, экспансированных с использованием искусственных АПК, оценивалась спустя 7 дней (А) и 21 день (В) с момента начала процедуры. Приведенные значения выражены в процентах от длины теломер интактных ЕК-клеток соответствующих доноров. Вариант (ИЛ-15:ИЛ-15R $\alpha$ ) был сконструирован с целью исключить неадекватность сигнала от мИЛ-15 в отсутствии Sushi – домена, как причину снижения длины теломер в ходе экспансии ЕК клеток.

# Цитотоксическая активность



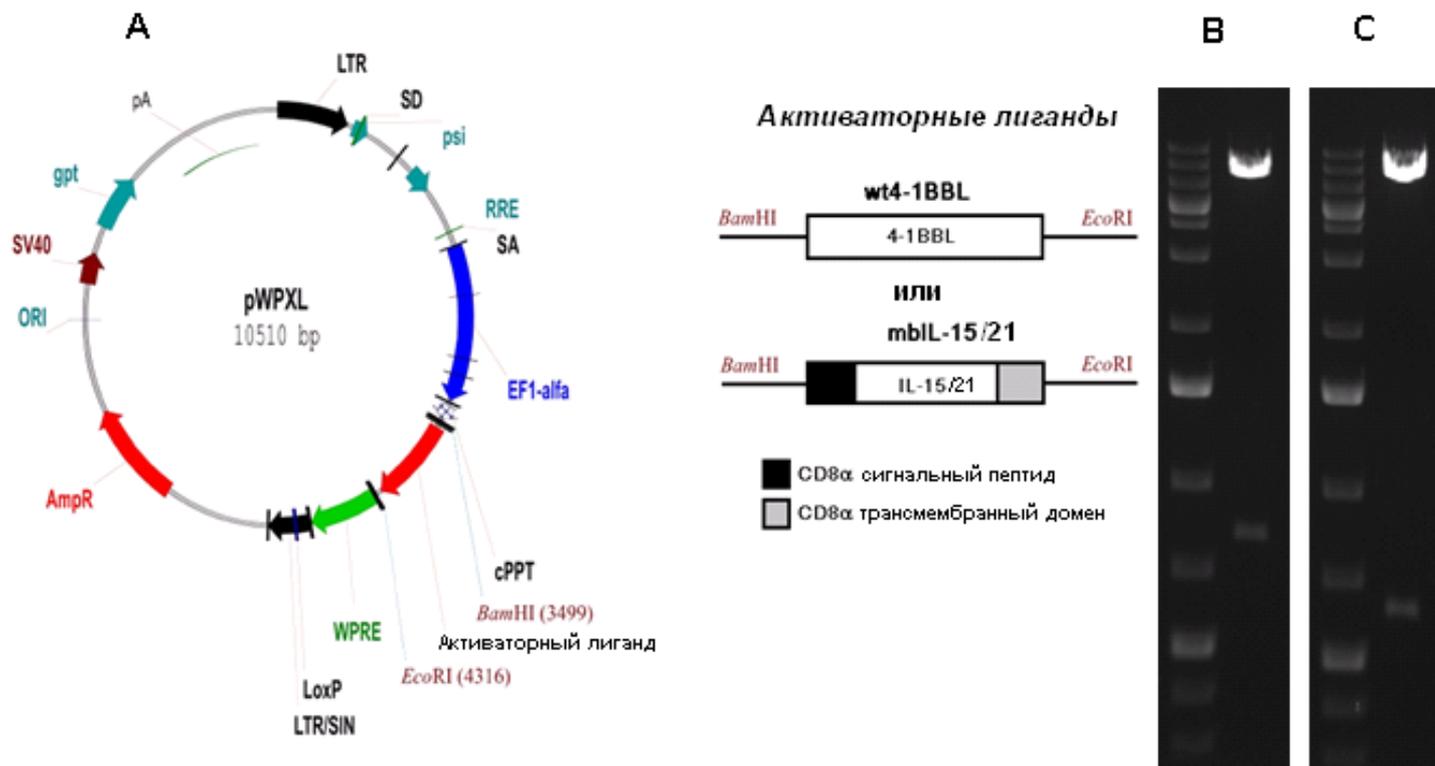
(A) Цитотоксическая активность полученных в результате экспансии, а также интактных донорских ЕК-клеток по отношению к клеткам линии 721.221 (HLA - негативная). (B) Секреция цитокинов в ответ на стимуляцию клетками K562. (C, D, E) цитотоксическая активность экспансированных и замороженных ЕК-клеток (рестимуляция + 24 часа после разморозки в культуре в присутствии 50 МЕ/мл ИЛ-2), в сравнении с клетками, не подвергавшимися процедуре заморозки/разморозки.

# Прямая и антителозависимая цитотоксическая активность



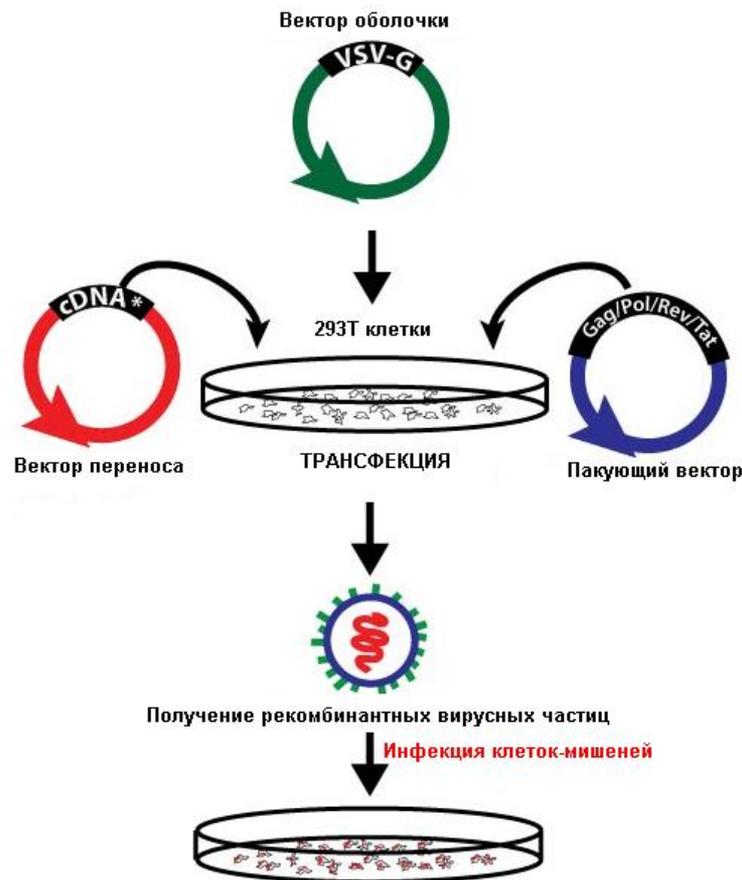
Прямая цитотоксическая активность экспансированных ЕК-клеток четырех различных доноров оценивалась на клеточных линиях ОМЛ (А, В), В – клеточных лимфобластных (С, D), нейробластомы (Е, F), карциномы (G), меланомы (H). А также в присутствии анти-CD20 (I, J) В – клеточные лимфобластные линии, анти-GD2 (K - нейробластома, L - меланома) антител.

# Создание экспрессионной конструкции, кодирующей активаторные лиганды



**Дизайн экспрессионной кассеты, кодирующей активаторные лиганды.** (A) Схема экспрессионной кассеты, встроенной в трансфер - плазмиду, кодирующую вирусный геном (адаптировано с сайта [www.addgene.org](http://www.addgene.org)) ; (B,C) Продукты рестрикционного анализа: верхний фрагмент соответствует плазмиде pWPXL, нижний фрагмент – экспрессионная кассета 4-1BBL (B) и mIL-15(C).

# Получение рекомбинантных псевдотипированных лентивирусных частиц, кодирующих активаторные лиганды, методом котрансфекции клеток 293Т.



Соответствующие плазмиды трансфецируют в клетки 293Т. Как следствие, в этих клетках начинается экспрессия вирусных белков с трансфецированных плазмидных векторов, а также транскрипция геномной РНК вируса. Затем происходит сборка вирусных частиц внутри трансфецированных клеток и их выход во внеклеточную среду. Далее производят сбор супернатанта, определяют титр полученных вирусных частиц, а затем инфицируют клетки-мишени с необходимой множественностью инфекции.

# Сортировка фидерных клеточных линий



## **FACS Vantage SE**

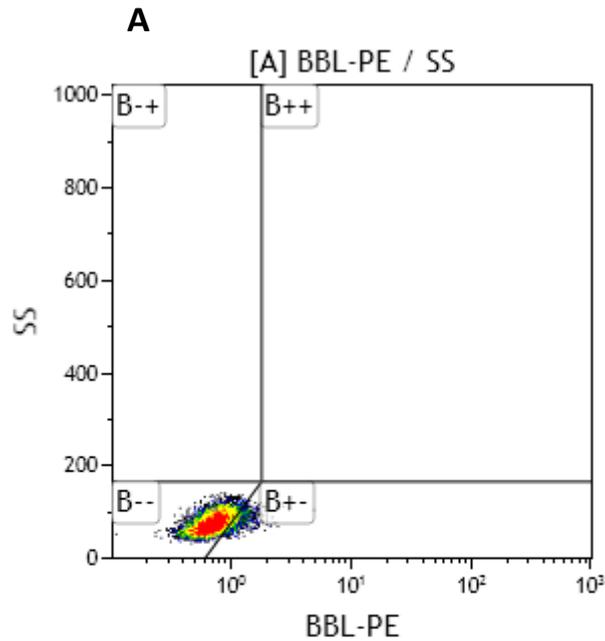
### ***Оптика:***

- Лазеры (488нм, 633нм)
- Фильтры (530/30, 575/26, 695/40, 630/22)

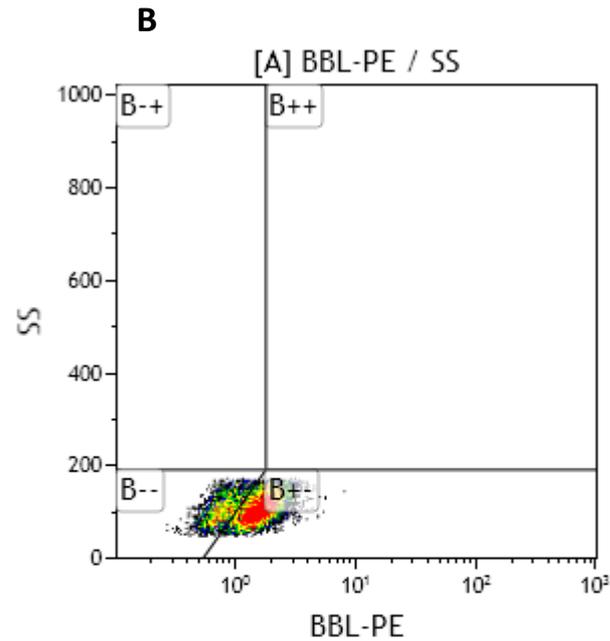
### ***Сортировка:***

На 2 популяции. Скорость: до 2000 соб./сек, с максимальной чистотой и выходом.

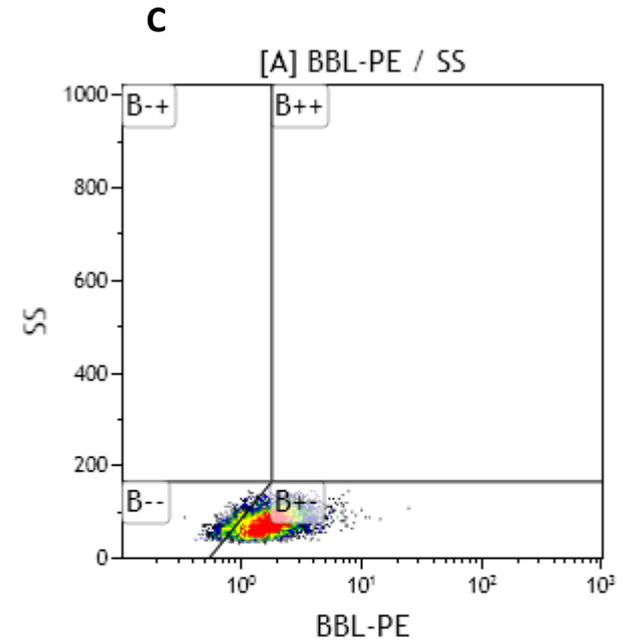
# Получение линии K562-4-1BBL



Gate	%Gated
All	100,00
B--	90,02
B-+	N/A
B+-	9,98
B++	N/A

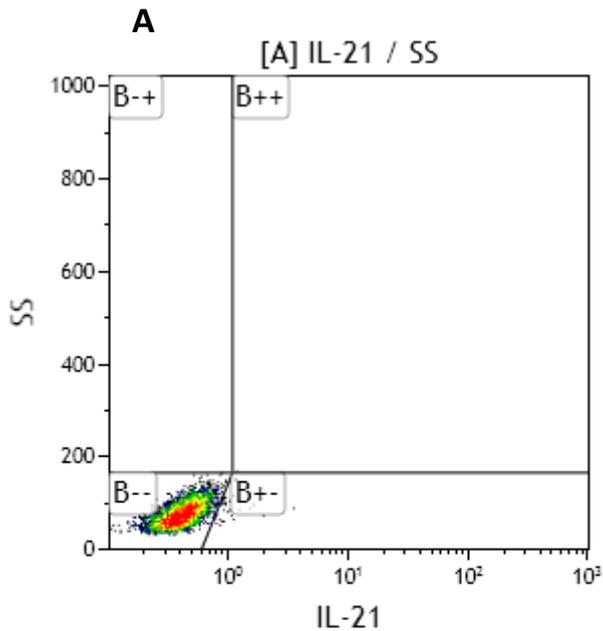


Gate	%Gated
All	100,00
B--	26,44
B-+	N/A
B+-	73,56
B++	N/A

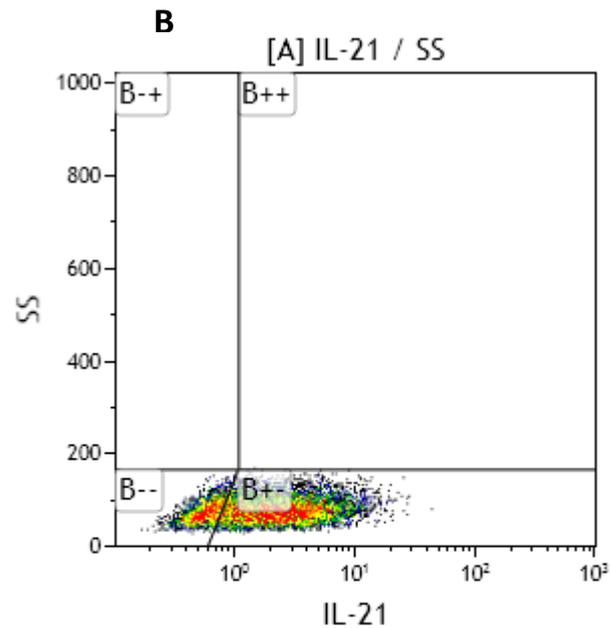


Gate	%Gated
All	100,00
B--	7,53
B-+	N/A
B+-	92,47
B++	N/A

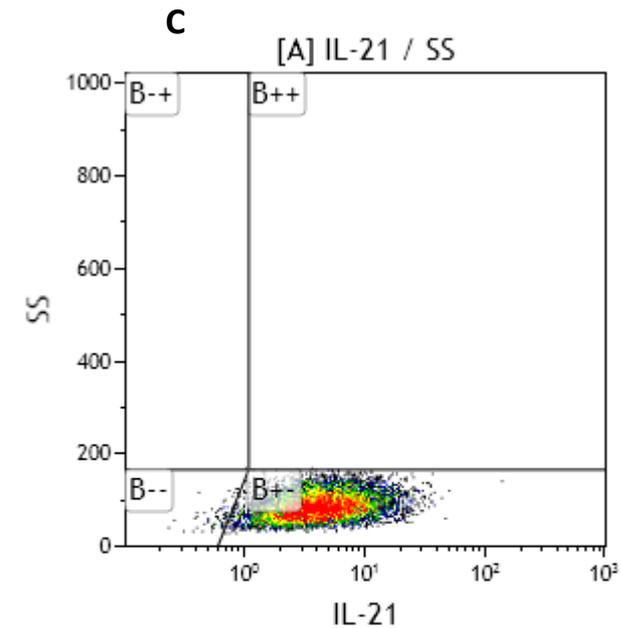
# Получение линии K562-4-1BBL\_mbIL21



Gate	%Gated
All	100,00
B--	99,17
B-+	N/A
B+-	0,81
B++	0,02



Gate	%Gated
All	100,00
B--	22,03
B-+	N/A
B+-	77,96
B++	0,01



Gate	%Gated
All	100,00
B--	0,75
B-+	N/A
B+-	99,25
B++	N/A

# Дальнейшие направления исследований

- **CARs (CD19, CD33)**
- **Хоуминг (CCR7, CXCR4)**
- **Молдинг (создание АПК с желаемым МНС гаплотипом для KIR – опосредованного ингибирования/лицензирования, либо лигирование антителами нежелательных KIR)**

**СПАСИБО ЗА  
ВНИМАНИЕ**