

**ТРАНСДУЦИРОВАННЫЕ HER2-CAR-NK-КЛЕТКИ ПРОЯВЛЯЮТ
ПОВЫШЕННУЮ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ
HER2-ПОЗИТИВНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

Алексеева Н. А. ¹,
Стрельцова М. А. ¹,
Вавилова Ю. Д. ¹,
Деев С. М. ¹,
Коваленко Е. И. ¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**HER2-CAR-NK CELLS EXHIBIT ENHANCED CYTOTOXIC ACTIVITY
TOWARDS HER2-POSITIVE TUMORS**

Alekseeva N. A. ^a,
Streltsova M. A. ^a,
Vavilova J. D. ^a,
Deyev S. M. ^a,
Kovalenko E. I. ^a

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science.

Резюме

Таргетное воздействие адоптивными иммунными клетками – один из современных и активно развивающихся подходов к терапии солидных опухолей. Экспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2 свойственна для 20% опухолей молочной железы и сопряжена с негативным исходом заболевания. В связи с этим актуальной является задача по получению HER2-специфических клеточных эффекторов, несущих химерный рецептор CAR. NK-клетки, или натуральные киллеры, являются перспективной основой для создания противораковых эффекторов. Они обладают широким арсеналом активирующих рецепторов, способных распознавать опухоль-ассоциированные маркеры, а также, в отличие от Т-клеток, не инициируют реакцию трансплантат против хозяина. Целью данного исследования являлось получение CAR-NK-клеточных эффекторов, способных таргетно элиминировать HER2-позитивные опухолевые мишени. NK-клетки для последующих экспериментов были получены методом негативной магнитной сепарации из периферических мононуклеаров, выделенных из крови добровольцев посредством центрифугирования в градиенте плотности. Модификация NK-клеток, активированных IL-2 и фидерными клетками K562-mb1121, проводилась методом ретровирусной трансдукции. Для накопления ретровирусных частиц, несущих конструкцию HER2-CAR, были использованы предварительно трансфицированные клетки Phoenix Ampho. В качестве антиген-распознающего домена была использована молекула DARPIn 9-29-HER2, обладающая аффинностью к дистальному I домену HER2. Доля трансдуцированных NK-клеток оценивалась по экспрессии репортерного белка GFP, выход рецептора HER2-CAR на поверхность клеточной мембраны детектировался по экспрессии внеклеточного домена с-Мус. Функциональная активность полученных HER2-CAR-NK-клеток оценивалась методом проточной цитометрии по уровню дегрануляции и продукции IFN γ в присутствии HER2-позитивных мишеней BT-474. Чтобы оценить литическую активность HER2-CAR-NK-клеток, методом клеточной сортировки были получены культуры HER2-CAR-экспрессирующих GFP⁺ NK-клеток и немодифицированных GFP⁻ NK-клеток. Лизис мишеней BT-474 оценивали по высвобождению кальцеина при инкубации с HER2-CAR и GFP- эффекторами. Все модифицированные GFP⁺ NK-клетки были способны экспрессировать рецептор HER2-CAR на поверхности клеточной мембраны. HER2-CAR-NK-клетки отличались более высоким уровнем дегрануляции и продукции IFN γ по сравнению с GFP⁻ нетрансдуцированными NK-клетками. Также несущие рецептор HER2-CAR NK-клетки обладали более высокой литической активностью в отношении BT-474. Таким образом, посредством генетической модификации на основе первичных NK-клеток нами были получены высокоэффективные агенты HER2-CAR-NK, способные таргетно распознавать HER2-позитивные опухолевые клетки и реализовывать в их присутствии цитотоксический и цитокинпродуцирующий потенциал. Расширение арсенала клеточных

эффекторов, направленных на лечение HER2-положительных опухолей молочной железы, позволит в перспективе увеличить потенциал персонализированной терапии опухолей.

Ключевые слова: NK-клетки; химерный антигенный рецептор; CAR; HER2; дарпин; солидные опухоли.

Abstract

Targeting by adoptive immune cells is one of the modern approaches to the solid tumors therapy. Expression of the epidermal growth factor receptor HER2 is common for 20% of breast tumors and is associated with a negative outcome. In this regard, obtaining HER2-specific cellular effectors carrying a chimeric CAR receptor appears to be a relevant task. NK cells have a wide arsenal of activating receptors capable of recognizing tumor-associated markers and do not initiate a graft-versus-host reaction. The goal of this study was to obtain CAR-NK cell effectors capable of HER2-positive tumor targets directed elimination. NK cells were obtained by negative magnetic separation from peripheral mononuclear cells isolated from volunteers' blood using density gradient centrifugation. Activated NK cells were modified by retroviral transduction. Preliminarily transfected Phoenix Ampho cells were used to accumulate retroviral particles carrying HER2-CAR construct. The DARPin 9-29-HER2 molecule with affinity for the HER2 distal domain I was used as the antigen-recognizing domain. The proportion of transduced NK cells was measured upon the GFP reporter protein expression, and the surface emergence of HER2-CAR receptors was detected upon expression of the c-Myc extracellular domain. All modified GFP⁺ NK cells were capable of expressing HER2-CAR receptors on the cell membrane. HER2-CAR NK cells' functional activity was measured via flow cytometry by degranulation intensity and IFN γ production in the presence of HER2-positive target cells BT-474. To assess the lytic activity of HER2-CAR NK cells, cultures of HER2-CAR-expressing GFP⁺ NK cells and unmodified GFP⁻ NK cells were obtained by cell sorting. Lysis of BT-474 targets was measured by calcein release upon incubation with HER2-CAR and GFP⁻ effectors. HER2-CAR NK cells were characterized by higher levels of degranulation and IFN γ production compared to GFP⁻NK cells. Also, HER2-CAR-NK cells have higher lytic activity towards BT-474. Thus, by means of genetic modification based on primary NK cells, we obtained highly effective HER2-CAR-NK agents capable of HER2-positive tumor cells targeted recognition and realizing cytotoxic and cytokine-producing potential in their presence. Expanding the arsenal of cellular effectors aimed at treating HER2-positive breast tumors will increase the potential of personalized tumor therapy in the future.

Keywords: NK cells; chimeric antigen receptor; CAR; HER2; DARPin; solid tumors.

1 Введение

Среди злокачественных опухолей рак молочной железы занимает второе место по встречаемости среди всей популяции людей в целом и первое место среди женщин. Около 20% опухолей молочной железы характеризуются высоким уровнем экспрессии рецептора эпидермального фактора роста HER2 (Her-2/neu, ERBB2), наличие которого сопряжено с краткими ремиссиями и высоким риском летального исхода [1]. Одним из подходов к таргетной терапии опухолей является адоптивная терапия CAR-лимфоцитами, несущими химерные рецепторы CAR, специфически распознающие опухолевые антигены. Препараты на основе HER2-специфичных CAR-T-клеток, нацеленных на клетки рака молочной железы, находятся на стадии клинических испытаний [2]. Однако NK-клетки, в отличие от T-клеток, не индуцируют реакцию трансплантат против хозяина [3,4]. На основе клеточной линии лимфомы NK-92 получены эффекторы HER2-CAR-NK92, способные элиминировать HER2-позитивные опухолевые клетки [5]. NK-92 требуют предварительного облучения перед применением в клинике и характеризуются высоким уровнем экспрессии ингибирующего рецептора NKG2A, что может приводить к сниженной цитотоксической активности в отношении HLA-E-экспрессирующих мишеней. NK-клетки периферической крови, в свою очередь, включают пул зрелых высокотоксичных клеток и не требуют предварительного облучения [6,7]. Эти свойства делают NK-клетки периферической крови перспективной основой для создания HER2-специфичных CAR-эффекторов для персонифицированной терапии рака молочной железы. Нами были получены HER2-CAR-NK-клетки на основе предварительно активированных *in vitro* NK-клеток периферической крови. В качестве антиген-распознающего домена рецептора CAR была использована антителоподобная молекула DARPIn 9-29-HER2, обладающая высокой аффинностью к дистальному I домену HER2, стабильной структурой и меньшими размерами по сравнению с scFc-доменами полноразмерных антител [8,9]. Мы также показали, что полученные HER2-CAR-NK-клетки отличаются высокой цитотоксической активностью и высокой продукцией IFN γ в отношении HER2-позитивной линии рака молочной железы BT-474, по сравнению с немодифицированными NK-клетками.

NK-клетки были изолированы методом негативной магнитной сепарации (Miltenyi Biotec, Германия) из PBMC, предварительно полученных посредством центрифугирования в градиенте плотности. NK-клетки культивировались в среде из 50% NK MACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия) и полной среды DMEM (Панэко, Россия) (с 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамин и антибиотиками-антимикотиками (1/100)), и активировались облученными (100 Гр) фидерными клетками K562-mbIL21 и 100 Ед/мл IL-2 (Hoffmann La-Roche, Швейцария) в течение 3-5 дней при 5% CO₂, 37 °C. Клеточные линии Phoenix Ampho и BT-474 культивировались в полной среде DMEM, 5% CO₂, 37 °C. Вектор GFP-9-29-HER2-CAR (далее – HER2-CAR) состоит из: DARPIn 9-29 - модуля распознавания антигена; EF1a

45 - конститутивного человеческого промотора hEF1a; с-мус - внеклеточного
46 фрагмента для детекции CAR; IgG1 - модуля-пространства из человеческого
47 IgG1; CD28-CD3 cyto - сигнального региона; GFP - репортерного белка.
48 Ретровирусный вектор GFP-9-29-HER2-CAR был псевдотипирован плазмидой
49 с гликопротеином оболочки RD-114. Плазмиды были со-трансфицированы в
50 соотношении 2:1. Трансфекция линии Phoenix Amphi (любезно предоставлена
51 д.б.н, проф. Александром Филатовым (Институт Иммунологии, Россия),
52 проводилась в чашках Петри, обработанных поли-L-лизинном (0,5 мг/мл), с
53 использованием набора для трансфекции на основе кальций-фосфата в среде
54 DMEM с 3% FBS. Супернатанты с ретровирусными векторами собирались
55 через 48 часов и концентрировались ультрацентрифугированием. Трандукция
56 НК-клеток проводилась в планшетах, обработанных раствором ретронектина
57 с концентрацией 20 µg/mL (Clontech/Takara, USA). Эффективность
58 трансдукции оценивалась по флуоресценции GFP и экспрессии
59 поверхностного с-мус с помощью проточной цитометрии через 3–5 дней
60 после трансдукции. Дегрануляция и продукция IFN γ НК-клетками
61 оценивалась с помощью проточной цитометрии (LongCyte, Challenbio). НК-
62 клетки инкубировались с ВТ-474 в полной среде DMEM, с добавлением
63 антител anti-CD107a-PE (Miltenyi Biotec, Германия) и брефелдином А (10
64 мкг/мл, Invitrogen, США) Е:Т = 1:1, t=2,5 ч, 37 °С, 5% CO $_2$. Уровень
65 внутриклеточной продукции оценивался посредством внутриклеточного
66 окрашивания антителами IFN γ -PE (Miltenyi Biotec, Германия) НК-клеток
67 после инкубации с ВТ-474 в течение 4 часов, Е:Т = 1:1. HER2-CAR-NK-клетки
68 были отсортированы с использованием клеточного сортировщика
69 FACS Vantage DiVa (Becton Dickinson, США) для получения фракций GFP $^-$ и
70 GFP $^+$. Литическая активность HER-CAR-NK-клеток и GFP $^-$ НК-клеток
71 оценивалась по высвобождению кальцеина (λ_{exc} = 490 nm и λ_{em} = 510-570 nm,
72 спектрофлуориметр Glomax Multi (Promega, США)) в супернатант клетками
73 ВТ-474, которые были предварительно маркированы Calcein-AM (2,5 мкМ)
74 (Biozol, Германия). Е:Т = 1:1, t=4 часа, 37 °С, 5% CO $_2$. Отрицательный
75 контроль (neg) - интактные клетки ВТ-474, положительный (pos) - клетки ВТ-
76 474, лизированные 1% Triton X-100 (Am-0694-0.1, США). Долю
77 лизированных клеток определяли по формуле: % = 100*(MFI –
78 MFI $_{neg}$)/(MFI $_{pos}$ - MFI). НК-клетки периферической крови, предварительно
79 активированные *in vitro*, были трансдуцированы ретровирусным вектором,
80 содержащим конструкцию HER2-CAR. Доля трансдуцированных клеток в
81 культуре была оценена по экспрессии репортерной молекулы GFP,
82 включенной в генетическую конструкцию HER2-CAR (Рис. 1А). Также по
83 экспрессии внеклеточного домена HER2-CAR с-Мус был подтвержден выход
84 рецепторов CAR на поверхность во всех трансдуцированных GFP $^+$ НК-
85 клетках (Рис. 1Б).

86 Функциональная активность полученных HER2-CAR-NK-клеток была
87 исследована в отношении HER2-экспрессирующей линии рака молочной
88 железы ВТ-474. Посредством проточной цитометрии был оценен уровень

89 экспрессии HER2 на поверхности клеток-мишеней BT-474 - клетки обладали
90 высоким уровнем экспрессии таргетной молекулы (Рис. 2А). При коинкубации
91 с BT-474 во фракции HER2-CAR-NK-клеток (GFP⁺) наблюдалась большая
92 доля дегранулирующих клеток CD107a⁺ по сравнению с
93 немодифицированными GFP⁻ NK-клетками (Рис. 2Б). Также HER2-CAR-NK-
94 клетки отличались более выраженной продукцией IFN γ по сравнению с GFP⁻
95 NK-клетками (Рис. 2В). Посредством кальцеинового теста была детектирована
96 повышенная литическая активность модифицированных HER2-CAR-NK-
97 клеток (Рис. 2Г). В то же время, немодифицированные GFP- NK-клетки также
98 были способны лизировать опухолевые мишени, дегранулировать и
99 продуцировать IFN γ в их присутствии (Рис 2Б-Г). Помимо взаимодействия
100 CAR и таргетной молекулы HER2 множество осей рецептор-лиганд
101 принимают участие в противоопухолевой реакции NK-клеток, что
102 обеспечивает сохранение противоопухолевого потенциала NK-клеток против
103 гетерогенных опухолей или при потере экспрессии HER2. Так, например,
104 известно, что в элиминации BT-474 принимают участие
105 высокодифференцированные CX3CR1⁺ NK-клетки, а менее
106 дифференцированные NKG2D⁺ NK-клетки вносят менее выраженный вклад
107 [10]. Также BT-474 несут две аллели HLA-C1, что делает их более
108 восприимчивыми к NK-клеткам, не экспрессирующим ингибирующие
109 рецепторы KIR2DL2/3, которые присутствуют в пуле NK-клеток
110 периферической крови большинства индивидов [11]. Таким образом, на
111 основе активированных первичных NK-клеток, обладающих натуральной
112 противоопухолевой активностью, были получены HER2-направленные CAR-
113 NK-клетки.

114 Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного
115 фонда (проект № 24-75-00160).

РИСУНКИ

Рисунок 1. Получение HER2-CAR-NK-клеток. А - Доля трансдуцированных GFP⁺ NK-клеток, несущих конструкцию HER2-CAR; Б - Демонстрация выхода рецептора HER2-CAR на поверхность клеточной мембраны трансдуцированных GFP⁺ NK-клеток по уровню экспрессии внеклеточного домена HER2-CAR (с-Мус).

Figure 1. Obtaining of HER2-CAR-NK cells. A - The proportion of transduced GFP⁺ NK cells carrying the HER2-CAR construct; B - Demonstration of the release of the HER2-CAR receptor onto the surface of the cell membrane of transduced GFP⁺ NK cells by the expression level of HER2-CAR extracellular domain (c-Myc).

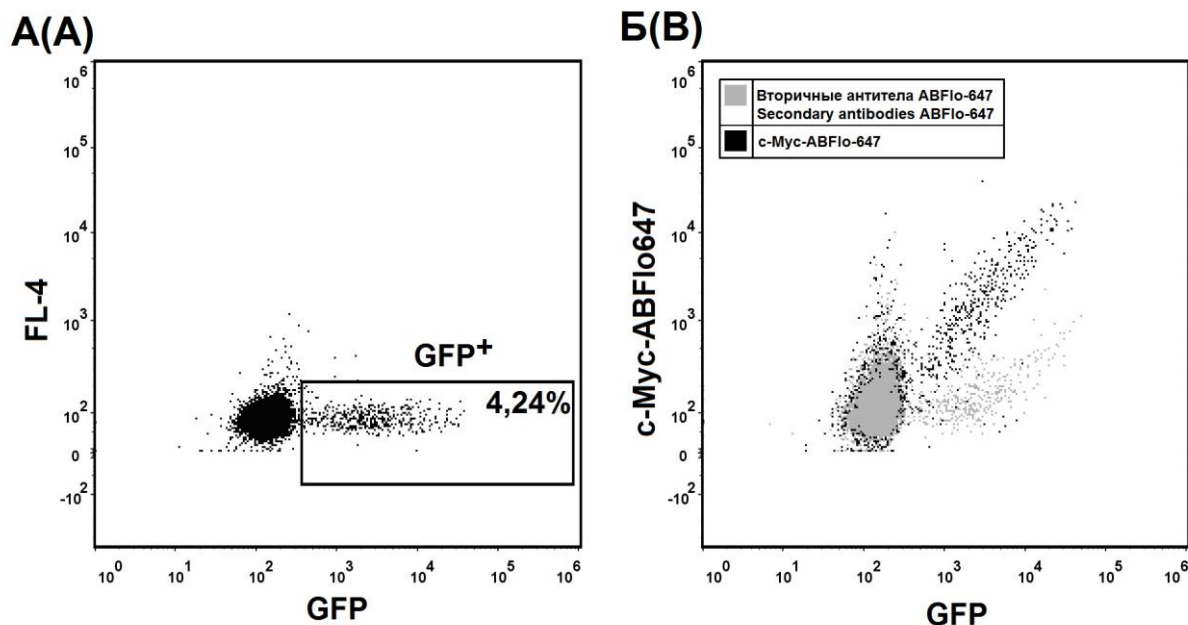
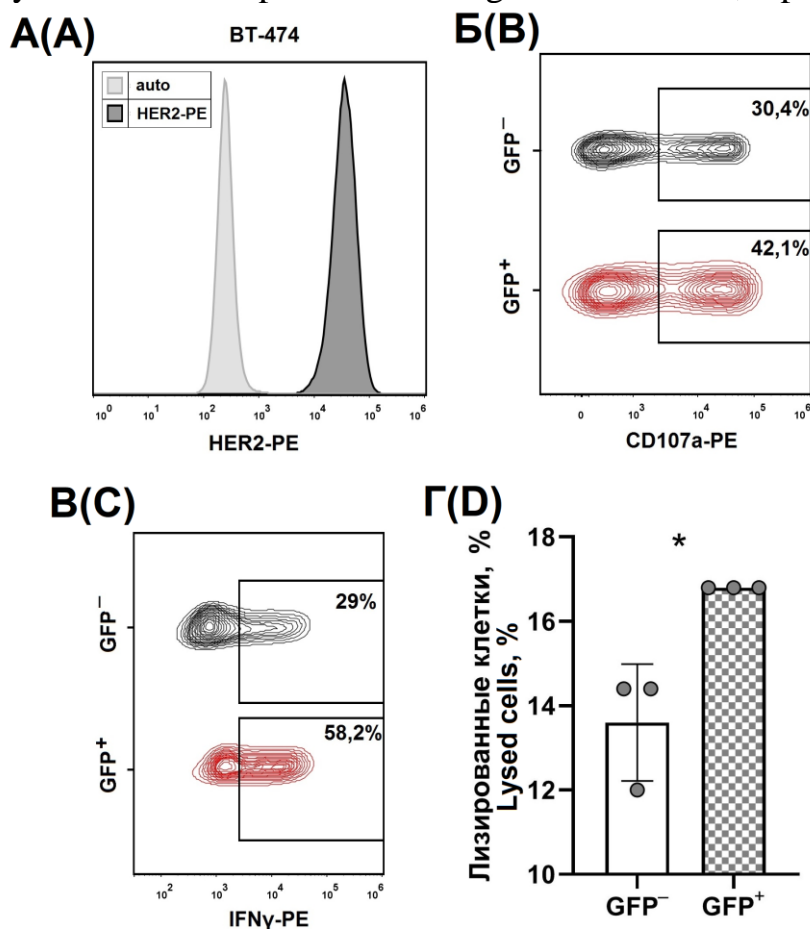


Рисунок 2. Функциональная активность HER2-CAR-NK-клеток при инкубации с HER2⁺ мишенями BT-474. А - Уровень экспрессии HER2 на поверхности клеток-мишеней BT-474; Б - Доля дегранулировавших CD107a⁺, HER2-CAR-NK-клеток (GFP⁺) и GFP⁻ NK-клеток при инкубации с HER2⁺ мишенями BT-474; В - Доля HER2-CAR-NK-клеток (GFP⁺) и GFP⁻ NK-клеток, продуцирующих IFN γ при инкубации с BT-474; Г - Доля лизированных BT-474 при инкубации с HER2-CAR-NK-клетками (GFP⁺) и GFP⁻ NK-клетками. Данные представлены в виде среднее \pm SD, статистический анализ данных проведен посредством t-теста Стьюдента, * p<0.05.

Figure 2. Functional activity of HER2-CAR-NK cells upon incubation with HER2⁺ BT-474 targets. A - The level of HER2 expression on the surface of BT-474 target cells; B - The proportion of degranulated CD107a⁺, HER2-CAR-NK cells (GFP⁺) and GFP⁻ NK cells upon incubation with HER2⁺ BT-474 targets; B - The proportion of HER2-CAR-NK cells (GFP⁺) and GFP⁻ NK cells producing IFN γ upon incubation with BT-474; G - The proportion of lysed BT-474 upon incubation with HER2-CAR-NK cells (GFP⁺) and GFP⁻ NK cells. Data are presented as mean \pm SD, statistical analysis of data was performed using Student's t-test, * p<0.05.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Алексеева Надежда Алексеевна, аспирант, м.н.с.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10;

телефон: 89163965739;

e-mail: nadalex@inbox.ru

Alekseeva N.A., PhD student, junior researcher

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science;

address: 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997, Moscow;

telephone: 89163965739;

e-mail: nadalex@inbox.ru

Блок 2. Информация об авторах

Стрельцова М. А., к.б.н., н.с. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Streltsova M.A., PhD, research scientist, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science;

Вавилова Ю. Д. к.б.н., н.с. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Vavilova J.D., PhD, research scientist, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science;

Деев С. М., академик, профессор, доктор наук, г.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Deyev SM, Academician, Professor, Doctor of Science, Principal research fellow, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science

Коваленко Е.И., к.б.н., с.н.с. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Kovalenko E.I. PhD, Senior Researcher Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science, 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997.

Блок 3. Метаданные статьи

ТРАНСДУЦИРОВАННЫЕ HER2-CAR-NK-КЛЕТКИ ПРОЯВЛЯЮТ
ПОВЫШЕННУЮ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ HER2-
ПОЗИТИВНЫХ ОПУХОЛЕЙ
HER2-CAR-NK CELLS EXHIBIT ENHANCED CYTOTOXIC ACTIVITY
TOWARDS HER2-POSITIVE TUMORS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

HER2-СПЕЦИФИЧНЫЕ CAR-NK-КЛЕТКИ
HER2-DIRECTED CAR-NK CELLS

Ключевые слова: NK-клетки; химерный антигенный рецептор; CAR; HER2; дарпин; солидные опухоли.

Keywords: NK cells; chimeric antigen receptor; CAR; HER2; DARPin; solid tumors.

Раздел Школа Клинической Иммунологии "Сочи-2025".

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

28.04.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Ahmed, N.; Brawley, V.; Hegde, M.; Bielanowicz, K.; Kalra, M.; Landi, D.; Robertson, C.; Gray, T.L.; Diouf, O.; Wakefield, A.; et al. HER2-specific chimeric antigen receptor–modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: A phase 1 dose-escalation trial. <i>JAMA Oncol.</i> 2017 , <i>3</i> , 1094–1101.	10.1001/jamaoncol.2017.0184
2	Alekseeva, N.A.; Boyko, A.A.; Shevchenko, M.A.; Grechikhina, M. V.; Streltsova, M.A.; Alekseeva, L.G.; Sapozhnikov, A.M.; Deyev, S.M.; Kovalenko, E.I. Three-Dimensional Model Analysis Revealed Differential Cytotoxic Effects of the NK-92 Cell Line and Primary NK Cells on Breast and Ovarian Carcinoma Cell Lines Mediated by Variations in Receptor–Ligand Interactions and Soluble Factor Profiles. <i>Biomedicines</i> 2024 , <i>12</i> (10), 2398.	10.3390/biomedicines12102398
3	Borst, L.; van der Burg, S.H.; van Hall, T. The NKG2A-HLA-E Axis as a Novel Checkpoint in the Tumor Microenvironment. <i>Clin. Cancer Res.</i> 2020 , <i>26</i> , 5549–5556.	10.1158/1078-0432.CCR-19-2095
4	Eitler, J.; Rackwitz, W.; Wotschel, N.; Gudipati, V.; Murali Shankar, N.; Sidorenkova, A.; Huppa, J.B.; Ortiz-Montero, P.; Opitz, C.; Künzel,	10.1136/jitc-2023-008155

	S.R.; et al. CAR-mediated targeting of NK cells overcomes tumor immune escape caused by ICAM-1 downregulation. <i>J. Immunother. Cancer</i> 2024 , <i>12</i> (2), e008155.	
5	Haroun-Izquierdo, A.; Vincenti, M.; Netskar, H.; Van Ooijen, H.; Zhang, B.; Bendzick, L.; Kanaya, M.; Momayyezi, P.; Li, S.; Wiiger, M.T.; et al. Adaptive single-KIR+NKG2C+ NK cells expanded from select superdonors show potent missing-self reactivity and efficiently control HLA-mismatched acute myeloid leukemia. <i>J. Immunother. cancer</i> 2022 , <i>10</i> (1), e005577corr1.	10.1136/jitc-2022-005577
6	Mehta, R.S.; Rezvani, K. Chimeric antigen receptor expressing natural killer cells for the immunotherapy of cancer. <i>Front. Immunol.</i> 2018 , <i>9</i> , 283.	10.3389/fimmu.2018.00283
7	Sapino, A.; Goia, M.; Recupero, D.; Marchiò, C. Current challenges for HER2 testing in diagnostic pathology: State of the art and controversial issues. <i>Front. Oncol.</i> 2013 , <i>3</i> , 129.	10.3389/fonc.2013.00129
8	Schönfeld, K.; Sahm, C.; Zhang, C.; Naundorf, S.; Brendel, C.; Odendahl, M.; Nowakowska, P.; Bönig, H.; Köhl, U.; Kloess, S.; et al. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. <i>Mol. Ther.</i> 2015 , <i>23</i> , 330–338.	10.1038/mt.2014.219
9	Shilova, O.N.; Deyev, S.M. DARPinS: Promising scaffolds for theranostics. <i>Acta Naturae</i> 2019 , <i>11</i> , 42–53.	10.32607/20758251-2019-11-4-42-53
10	Sivori, S.; Vacca, P.; Del Zotto, G.; Munari, E.; Mingari, M.C.; Moretta,	10.1038/s41423-019-0206-4

	L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. <i>Cell. Mol. Immunol.</i> 2019 , <i>16</i> , 430–441.	
11	Stepanov, A. V.; Kalinin, R.S.; Shipunova, V.O.; Zhang, D.; Xie, J.; Rubtsov, Y.P.; Ukrainskaya, V.M.; Schulga, A.; Konovalova, E. V.; Volkov, D. V.; et al. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 2022 , <i>119</i> (46), e2210562119.	10.1073/pnas.2210562119