



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 5/0646 (2023.02); C12N 2330/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2021139381, 28.12.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2021

Дата регистрации:
24.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2021

(45) Опубликовано: 24.04.2023 Бюл. № 12

Адрес для переписки:
123298, Москва, ул. 3-я Хорошёвская, 20, ООО
"Текон Медицинские приборы"

(72) Автор(ы):

Абакушина Елена Вячеславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Текон Медицинские приборы" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KWEON S. et al., Expansion of Human NK Cells Using K562 Cells Expressing OX40 Ligand and Short Exposure to IL-21, Front Immunol., 2019, 1, 879, doi: 10.3389/fimmu.2019.00879. CASIMIR DE RHAM et al., The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors, Arthritis Res Ther., 2007, (см. прод.)

(54) Способ долгосрочного культивирования и экспансии НК-клеток с высокой жизнеспособностью и функциональной активностью

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области клеточной биологии, биотехнологии и медицины, а именно к способу культивирования *in vitro* естественных киллеров (НК-клеток) в питательной среде с комбинацией по меньшей мере двух цитокинов: IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 и фидерными клетками K562-mb15-41BBL или K562-mb21-41BBL. Для осуществления указанного способа сначала добавляют в питательную среду НК-клетки, выделенные из мононуклеарных клеток (РВМС) периферической крови человека в концентрации от 1×10^5 до 1×10^6 на 1 мл питательной среды. После чего в питательную среду добавляют интерлейкины. Затем в среду добавляют фидерные клетки в соотношениях от

1:1 до 1:10. При этом весь процесс культивирования НК-клеток составляет 14-21 суток, в течение которого замену питательной среды проводят каждые 2-5 суток от начала культивирования. В качестве питательной среды используют RPMI-1640, на этапе (b) интерлейкины добавляют в питательную среду, начиная с 0 суток, на этапе (c) начинают на 5-8 сутки. Культивирование проводят в мультигазовом инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ или 5% CO₂ и 5-10% O₂. Заявленный способ позволяет получать клеточные препараты с большим содержанием НК-клеток, а именно до 50×10^7 клеток, и позволяет повышать функциональную активность НК-клеток. 4 з.п. ф-лы, 6 ил., 5 пр.

(56) (продолжение):

9 (6), R125, doi: 10.1186/ar2336. OYER J.L. et al., Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, Particle-based approach, Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2015, 21, pp. 632-639, doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.037. US 2018245044 A1, 30.08.2018. АБАКУШИНА Е.В. и др., Основные свойства и функции НК-клеток человека, Иммунология, 2012, No. 4, 220-225.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 5/0646 (2023.02); C12N 2330/00 (2023.02)

(21)(22) Application: **2021139381, 28.12.2021**

(24) Effective date for property rights:
28.12.2021

Registration date:
24.04.2023

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2021**

(45) Date of publication: **24.04.2023** Bull. № 12

Mail address:

**123298, Moskva, ul. 3-ya Khoroshevskaya, 20, OOO
"Tekon Meditsinskie pribory"**

(72) Inventor(s):

Abakushina Elena Vyacheslavovna (RU)

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Tekon Meditsinskie pribory" (RU)**

(54) **METHOD FOR LONG-TERM CULTIVATION AND EXPANSION OF NK CELLS WITH HIGH VIABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: biology; biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a method for in vitro cultivation of natural killer (NK cells) in a nutrient medium with a combination of at least two cytokines: IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 and K562-mb15-41BBL or K562-mb21-41BBL feeder cells. To implement this method, NK cells isolated from mononuclear cells (PBMC) of human peripheral blood are first added to the nutrient medium at a concentration of 1×10^5 to 1×10^6 per 1 ml of nutrient medium. After that, interleukins are added to the nutrient medium. Then feeder cells are added to the medium in ratios from 1:1 to 1:10. The entire process of culturing NK cells is

14–21 days, during which the replacement of the nutrient medium is carried out every 2–5 days from the beginning of cultivation. RPMI-1640 is used as a nutrient medium, in step (b) interleukins are added to the nutrient medium starting from day 0, in step (c) they start on day 5–8. Cultivation is carried out in a multi-gas incubator at 37°C in an atmosphere of 5% of CO₂ or 5% of CO₂ and 5-10% of O₂.

EFFECT: claimed method allows to obtain cell preparations with a high content of NK cells, namely up to 50×10^7 cells, and allows to increase the functional activity of NK cells.

4 cl, 6 dwg, 5 ex

RU 2 794 770 C1

RU 2 794 770 C1

Область техники

Изобретение относится к области медицины и биотехнологии, а именно к клеточной биотехнологии и может применяться для увеличения количества (экспансии) естественных киллеров (далее НК-клеток), полученных из периферической крови донора или онкологического больного.

За последние десятилетия появилось множество исследований, направленных на изучение и использование НК-клеток в адоптивной клеточной иммунотерапии против многих типов рака. В литературе сообщается о многочисленных способах культивирования и активации НК-клеток человека с использованием цитокинов и фидерных клеток, однако многие из этих подходов имеют ограничения, связанные с незначительным увеличением количества клеток при культивировании, необходимостью в добавлении больших количеств цитокинов или фидерных клеток для активации, регуляции пролиферации и апоптоза клеточной культуры, а также процессов активации и ингибирования основных НК-клеточных рецепторов [1].

НК-клетки являются компонентом врожденной иммунной системы, характеризующиеся $CD45^+CD3^-CD56^+$ фенотипом, которые действуют как ключевые регуляторы и проявляют сильную противоопухолевую цитолитическую активность. Для оценки терапевтической эффективности адоптивной НК-клеточной иммунотерапии на доклинических этапах с возможностью клинического применения существует потребность в разработке надежных протоколов для экспансии НК-клеток *ex vivo*.

Среди описанных методов представлены способы культивирования НК-клеток на основе аутологических и аллогенных НК-клеток, НК-клеточных линий, генетически модифицированных НК-клеток, включая несущие химерные рецепторы антигена CAR-NK. Способы экспансии НК-клеток *in vitro* отличаются также по длительности культивирования, составу питательных сред и режиму замены среды во время культивирования, составу активационных смесей из цитокинов, типу фидерных клеток и способу их обработки, включая замораживание и облучение.

При описании заявляемого способа и аналогов используются термины, имеющее следующее значение:

Термин «долгосрочное культивирование» относится к способу культивирования клеток, при котором клетки добавляются к питательной среде, составленной из всех необходимых компонентов, и культивируются не менее 14 дней. Культивирование прекращают на 21 сутки, а клетки и/или компоненты в среде собирают и по желанию очищают.

Термин «экспансия» используется для описания процесса быстрого увеличения количества клеток, в данном описании является синонимом к термину «генерация клеток».

Термин «ко-культивирование» относится к способу одновременного культивирования двух и более типов клеток/клеточных линий.

Термин «жизнеспособность клеток» относится к способности клеток выживать в культуре при заданной совокупности условий культивирования или экспериментальных отклонениях. Данный термин включает также отношение той части клеток, которая в определенное время является живой, к суммарному количеству живых и мертвых клеток в культуре в указанное время.

Термин «функциональная активность клеток» относится к характеристикам клеток, включающим описание иммунофенотипов клеток и их цитолитической функции за счет продукции цитокинов.

Термин «клеточная линия» относится к популяциям опухолевых клеток, используемых

в качестве фидерных клеток для ко-культивирования с НК-клетками. Многочисленные клеточные линии поставляются коммерческими организациями, в частности Американской коллекцией типовых культур (АТСС).

Уровень техники

5 Известен способ «Methods For Expansion Of Natural Killer (NK) Cell Subset And Related Compositions And Methods» по заявке WO2020107002. В известном способе по культивированию и экспансии НК-клеток с иммунофенотипами $CD3^-CD45^+CD56^+$, $CD3^-CD56^+CD45^+FcR\gamma^-$, с облученными фидерными клетками 221.АЕН в соотношениях
 10 от 1:10 до 10:1. Выделение субпопуляций с иммунофенотипами $CD3^-CD57^+$, $CD3^-CD56^+$, $CD3^-CD16^+$, $CD3^-CD56^+NKG2A^-CD161^-$ проводили из мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), полученных с помощью афереза или лейкофереза. В питательную среду добавляли 100 IU/мл рекомбинантного IL-2 и 50 нг/мл
 15 моноклонального антитела анти-CD3. Замену питательной среды осуществляли на 5-7 день и далее каждые 2-3 дня. Количество НК-клеток увеличилось в 100-2500 раз. К недостаткам известного способа можно отнести то, что для культивирования НК-клеток используют только один цитокин - интерлейкин-2 (IL-2), а не комбинацию цитокинов, что не позволяет достигнуть высокого уровня пролиферации (увеличения количества) НК-клеток. В качестве фидерных клеток используется клеточная линия 221.АЕН,
 20 которая не является классической мишенью для НК-клеток. Это также не позволяет достигнуть высокого уровня пролиферации НК-клеток, которое можно достичь при ко-культивировании с фидерными клетками, предложенными в заявляемом способе.

Известен способ «Method For Culturing Natural Killer Cells Using T Cells» по заявке WO2016085248. В известном способе НК-клетки выделяют из РВМС периферической
 25 крови человека. НК-клетки получают из клеток РВМС путем $CD3^+$ -сепарации. Для экспансии НК-клеток использовали Т-клетки в качестве фидерных клеток, в особенности использовали $CD4^+$ Т-клетки, культивируемые *ex vivo*. При этом использовали
 30 инактивированные или не облученные выделенные из РВМС $CD4^+$ Т-клетки или Т-клеточные линии, такие как Н9 или NuT78. Питательная среда содержит: основную среду (AIM-V medium, RIMI-1640, CellGro SCGM, X-VIVO20, IMDM или DMEM); дополнительные компоненты (любую сыворотку, например, аутологичную); моноклональное антитело anti-CD3 в концентрации 0,1-100 нг/мл (например, 10 нг/мл ОКТ-3); интерлейкин из группы IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21 в концентрации 10-2000
 35 Ед/мл (например, 500 Ед/мл IL-2). Фидерные клетки и НК-клетки вносят в питательную среду одновременно в соотношении по меньшей мере 1:1, более точно 2:1-20:1, наиболее точно 5:1. НК-клетки культивируют в течение по меньшей мере 5 дней, точнее 5-60 дней, более точно 14-21 день, но не ограничиваются этим. Стимуляция начинается на 0 день культивирования и может повторяться с интервалами 5-12 дней, конкретно 7 дней, но
 40 не ограничивается этим. Клетки можно собирать через 5 дней или более, конкретно через 14 дней после последней стимуляции. Дополнительно в способе рассматривается рестимуляция антителами и интерлейкинами с интервалами 5-12 сутки, конкретно на 7 сутки. Дополнительно рассматривалась рестимуляция фидерными клетками. Данный способ приводит к активации НК-клеток за счет увеличения экспрессии НКр44 и НКр46
 45 рецепторов. К достоинствам известного способа можно отнести задекларированную жизнеспособность НК-клеток в 80% или выше. К недостаткам известного способа можно отнести активацию только двух рецепторов НКр44 и НКр46. Так же применение Т-клеток может усложнять процесс введения клеток пациентам для их лечения (этот

недостаток указывается и в описании самого известного способа).

В качестве прототипа принят известный способ «Method for natural killer cell expansion» по заявке US2018245044. Известный способ культивирования *in vitro* и размножения НК-клеток в питательной среде включает следующие этапы:

- 5 а) добавление IL-21 в начале процесса культивирования в питательную среду;
- б) многократное добавление в питательную среду IL-2 и/или IL-15;
- в) многократное добавление фидерных клеток или их мембранных частиц к питательной среде, где фидерные клетки являются производными В-клеток, иммортализованные EBV;

10 При этом IL-21 и фидерные клетки добавляются в питательную среду с 0 дня. Установлено, что добавление указанного IL-21 в начале процесса культивирования и использование фидерных клеток, полученных из В-клеток, EBV, таких как SMI-EBV-LCL, приводят к очень высоким скоростям экспансии. Эффективная концентрация IL-21 в питательной среде может составлять от 0,1 до 1000 нг/мл. Эффективная
 15 концентрация IL-15 в указанной среде для культивирования клеток может составлять от 0,1 до 1000 нг/мл. IL-2 и IL-15 могут быть добавлены вместе. Многократное добавление фидерных клеток к питательной среде может быть выполнено между 5-м и 16-м днем. Соотношение НК-клеток к фидерным клеткам составляет от 1:100 до 1:1. Начальная концентрация НК-клеток в питательной среде содержит популяцию $2,5 \times 10^4$
 20 НК-клеток в 1 мл питательной среды или $5,25 \times 10^5$ на 1 мл питательной среды (включая фидерные клетки). Питательная среда включает среду TechMACS (Miltenyi Biotec GmbH) с добавлением 5% сыворотки крови человека. В другом варианте осуществления среда для культивирования НК-клеток включает среду для роста стволовых клеток SCGM
 25 (Cell Genix) с добавлением 5% человеческой сыворотки типа АВ и 500 Ед/мл IL-2. Могут быть использованы среды X-Vivo 10, X-Vivo 15, BINKIT NK Cell Initial Medium (Cosmo Bio USA), AIM-V (Invitrogen), DMEM / F12. К недостаткам прототипа можно отнести то, что в качестве фидерных клеток предложено использовать трансформированную вирусом Эпштейн-Барр лимфобластную клеточную линию, трансфекция и поддержание
 30 активной трансформированной клеточной линии, которой является сложным многостадийным процессом.

В заявляемом способе предложено использование типов фидерных клеток, полученных из опухолевых клеток, например, K-562. Это позволяет получить НК-клетки с одинаковым уровнем пролиферации и экспансии и позволяет упростить процесс
 35 получения фидерных клеток.

В прототипе для экспансии НК-клеток предложено использовать IL-21 с последующим добавлением IL-2 и/или IL-15. Перечисленные интерлейкины являются основными, используемыми в протоколах активации НК-клеток, которые улучшают
 40 противоопухолевую функцию НК-клеток и усиливают их пролиферацию *in vitro* и *in vivo*. Однако различные их комбинации могут приводить к активации разных рецепторов НК-клеток, что может приводить к различным результатам по их цитотоксичности. В прототипе не приводится информация об активационных маркерах полученных НК-клеток, что не позволяет сделать вывод об уровне их активации и их функциональной активности.

45 Использование в известном способе аутологичной сыворотки человека для культивирования НК-клеток может приводить к ингибированию активации НК-клеток за счет блокировки рецепторов.

Задачей изобретения является расширение арсенала технических средств культивирования НК-клеток и устранения отмеченных недостатков, присущих известным

техническим решениям. Был осуществлен подбор состава питательной среды и комбинаций активирующих субстанций, включая цитокины, фидерные клетки и/или моноклональные антитела.

5 Было осуществлено определение условий и длительности культивирования НК-клеток. Комбинация подобранных составов и условий привела к многократной экспансии и активации полученных НК-клеток.

Технический результат состоит в том, что заявленный способ долгосрочного культивирования и экспансии НК-клеток с использованием цитокинов и фидерных клеток позволяет *in vitro* получать клеточные препараты с большим содержанием НК-клеток, а именно до 50×10^7 клеток. Заявленный способ позволяет повышать функциональную активность НК-клеток. Так определение функциональной активности НК-клеток в конце процесса культивирования показывает, что по меньшей мере 80% клеток РВМС имеют фенотип НК-клеток и по меньшей мере 70% НК-клеток имеют активированный фенотип, включая экспрессию рецепторов CD38, CD69, HLA-DR, CD95, NKR.

Технический результат достигается тем, что способ культивирования НК-клеток в питательной среде, содержащей комбинацию по меньшей мере двух цитокинов, включает этапы:

20 (а) добавление в питательную среду НК-клеток, выделенных из мононуклеарных клеток (РВМС) периферической крови человека в концентрации $(1-10) \times 10^5$ на 1 мл питательной среды;

(б) добавление в питательную среду фидерных клеток.

При этом добавление одних из следующих фидерных клеток: K-562, Jurkat, РВМС, генетически модифицированной линии K562-mb15-41BBL или K562-mb21-41BBL в питательную среду на этапе (б) начинают на 5-8 сутки, весь процесс культивирования НК-клеток составляет 14-21 суток, в течение которого периодически меняют часть питательной среды на свежую питательную среду.

30 При этом могут использовать питательную среду, которая помимо комбинации по меньшей мере двух цитокинов содержит основную среду и дополнительный компонент.

В качестве основной среды могут использовать одну из следующих сред: RPMI-1640, TexMacs, X-VIVO 10, X-VIVO 20, AIM V.

35 В качестве дополнительного компонента могут использовать одну из следующих составляющих: эмбриональную бычью сыворотку (FBS), альбумин человека, заменитель сыворотки NU-SERUM или их аналоги в концентрации 5-10%.

В качестве цитокинов могут использовать комбинацию из по меньшей мере двух следующих интерлейкинов: интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин -15 (IL-15), интерлейкин-18 (IL-18), интерлейкин-21 (IL-21), в концентрации 0,1-500 нг на 1 мл питательной среды.

40 Для питательной среды могут дополнительно использовать моноклональные антитела anti-CD3 и/или anti-CD16 в концентрации 0,1-50 нг/мл.

НК-клетки по отношению к фидерным клеткам могут вносить в соотношениях от 1:1 до 1:10.

Замену питательной среды для культивирования НК-клеток могут проводить каждые 2-5 суток от начала культивирования.

45 Определение жизнеспособности, количества и функциональной активности НК-клеток в составе РВМС могут проводить при каждой замене питательной среды.

Сущность изобретения

Изобретение поясняется подробным описанием, примерами выполнения и фигурами, на которых изображено:

На фиг. 1 изображена морфология популяции активированных НК-клеток, полученных при культивировании в соответствии со способом культивирования, описанном в данном изобретении на 1-ые (слева) и на 10-ые (справа) сутки культивирования. Микрофотографии получены на инвертированном микроскопе (Leica Microsystems, Германия), без окрашивания, увеличение в 400 раз.

На фиг. 2 изображены два графика динамики пролиферации НК-клеток при культивировании в среде, не содержащей цитокины (незакрашенные ромбы) и содержащей цитокины IL-2, IL-15 и IL-21 (закрашенные треугольники) в течении 48 часов.

На фиг. 3 представлен фенотипический профиль маркеров РВМС, включая НК-клетки, полученный с помощью метода проточной цитометрии. Анализ проводили на 0, 7 и 14 сутки культивирования. Для анализа были выбраны следующие активационные маркеры: CD38, CD69, CD314, HLA-DR. Обозначения: сплошной линией обозначены «0 сутки», пунктирной - обозначены «7 сутки», точечной - обозначены «14 сутки».

На фиг. 4 представлено сравнение пролиферативной активности (конфлюентности) НК-клеток в различные сроки после активации комбинацией цитокинов.

Обозначения: закрашенные треугольники - НК-клетки на 0 сутки культивирования; закрашенные квадраты - НК-клетки на 3 сутки культивирования; не закрашенные треугольники - НК-клетки на 5 сутки культивирования; кресты - НК-клетки на 7 сутки культивирования.

На фиг. 5 представлены динамики уменьшения количества живых клеток-мишеней (флуоресценция САМ) в цитотоксическом тесте, в каждой лунке 24-луночного планшета, в среде с комбинацией цитокинов, записанные на протяжении 2-х часов, где:

- на 0 день сразу после начала активации НК-клеток (1-3 клетки по горизонтали);

- на 3 день после активации (4-6 клетки по горизонтали).

(А, В, С, D - клетки по вертикали, где А, В - здоровый донор; С, D - онкобольной).

А, С - соотношение мишень: эффектор 1:20;

В, D - соотношение мишень: эффектор 1:10.

На фиг. 6 представлены динамики изменения концентраций цитокинов в супернатантах на 1, 3 и 5 сутки культивирования НК-клеток в питательной среде.

Обозначения: точечная линия - IL-2, закрашенная сплошная линия - IFN- γ , пунктирная линия - IL-6, не закрашенная сплошная - TNF- α .

Описание изобретения

Процесс культивирования НК-клеток начинается с выделения мононуклеарных клеток (РВМС) из периферической крови человека по стандартной методике градиентного центрифугирования. Для этого гепаринизированную венозную кровь предварительно разводят фосфатно-солевым буфером (PBS) и наслаивают на градиент фиколла (плотностью 1,077 г/см³), после чего отобранные РВМС двукратно отмывают PBS центрифугированием. В одном варианте выделение РВМС проводят путем лейкофереза в постоянном потоке крови на автоматических сепараторах крови, что обеспечивает более высокую чистоту и концентрацию РВМС в продукте. Клетки получают, накапливают и подвергают лабораторным воздействиям в асептических условиях, способных обеспечить минимальное загрязнение и минимум примесей. Клетки могут быть получены от здоровых доноров и от онкобольных пациентов.

Затем, для культивирования НК-клеток в питательной среде, лимфоциты, выделенные на градиенте плотности или путем лейкофереза из периферической крови больного (аутологичные) или здорового донора (аллогенные), активируют *in vitro* в питательной среде, состоящей из основной среды, дополнительного компонента и комбинации по

меньшей мере двух рекомбинантных цитокинов человека. В качестве основной среды используют одну из следующих сред: RPMI-1640, TexMaCS, X-VIVO 10, X-VIVO 20, AIM-V. В качестве дополнительного компонента используют одну из следующих составляющих: эмбриональную бычью сыворотку (FBS), альбумин человека, заменитель сыворотки NU-SERUM или их аналоги в концентрации 5-10%. В качестве цитокинов используют рекомбинантные цитокины человека (IL-2, IL-15, IL-18, IL-21) в концентрации 0,1-500 нг на 1 мл питательной среды.

Для питательной среды дополнительно могут использовать моноклональные антитела anti-CD3 и/или anti-CD16 в концентрации 0,1-50 нг/мл. Для культивирования используют 6-ти или 24-луночный планшет. При увеличении количества клеток в одной лунке планшета более 2-6*10⁶ клеток/мл осуществляют пересев клеток на 2-4 новые лунки.

НК-клетки на этапе (а) вносят в концентрации 1*10⁵-1*10⁶ клеток/мл в необходимом объеме питательной среды на лунку. Культивирование проводят при 37°C в CO₂-инкубаторе с концентрацией CO₂ 5% на протяжении 14-21 суток. В одном варианте осуществления культивирование проводят в мультигазовом инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и 5-10% O₂.

На 0 сутки культивирования в среду вносят цитокины в комбинациях или по отдельности, а также могут вносить моноклональные антитела. Первые 2 суток культивирование проводят без замены питательной среды. Затем каждые 2-5 суток проводят замену части (например, половины) питательной среды на свежую питательную среду. При этом свежая питательная среда может не содержать цитокинов.

Затем на этапе (b) производят ко-культивирование НК-клеток с фидерными клетками, для чего в питательную среду добавляют фидерные клетки. В качестве фидерных клеток используют следующие клеточные линии: K-562, Jurkat cells или PBMС, а также генетически модифицированные линии, включая K562-mb15-41BBL или K562-mb21-41BBL. Фидерные клетки предварительно облучают или обрабатывают митамицином С для устранения пролиферативной активности. НК-клетки по отношению к фидерным клеткам вносят в соотношениях от 1:1 до 1:10, например - 1:1, 1:3, 1:5, 1:10. Здесь термин "соотношение" относится к соотношению, основанному на количестве клеток.

В одном варианте осуществления фидерные клетки ко-культивируют без последующей замены питательной среды с добавлением комплекса цитокинов.

Каждый день проводится микроскопическая визуализация клеточной суспензии. На 0, 7, 14 и 21 сутки культивирования проводят оценку жизнеспособности, пролиферативной активности НК-клеток и фенотипирование на проточном цитометре субпопуляций CD3/CD16/CD56 лимфоцитов и экспрессию рецепторов активации НК-клеток. Цитотоксическую активность активированных НК-клеток оценивают на 7 и 14 сутки культивирования. На 21 сутки культивирования определяют концентрации факторов роста, хемокинов и цитокинов в среде культивирования.

Одним из общепринятых методов увеличения активности цитотоксических лимфоцитов (в частности НК-клеток) остается культивирование *in vitro* периферических мононуклеаров в сочетании с цитокинами, антителами, ростовыми факторами или фидерными клетками. В данном изобретении был предложен способ долгосрочного культивирования и экспансии НК-клеток с добавлением комбинации цитокинов IL-2, IL-15, IL-18 и моноклональных anti-CD3 и anti-CD16 антител, чтобы получить большое количество НК-клеток с высокой цитотоксической активностью без уменьшения их жизнеспособности. Настоящее изобретение может быть использовано в клинике для клеточной терапии иммунопатологий, включая использования НК-клеток в адоптивной

иммунотерапии рака, а также в исследованиях, направленных на использование активированных клеток для лечения аллергий и иммуносупрессивных состояний, например, при COVID-19.

5 Пример 1 Долгосрочное культивирование НК-клеток с высокой жизнеспособностью и функциональной активностью.

Для получения НК-клеток с целью долгосрочного культивирования, их экспансии и повышения функциональной активности у здорового донора собирали венозную кровь в пробирки с гепарином. Далее проводили выделение РВМС согласно стандартной методике на градиенте плотности Hystopaque-1077 (Sigma Aldrich, США).

10 Культивирование проводили в питательной среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной сыворотки крови телят (FBS) с добавлением моноклональных антител anti-CD3 в концентрации 30 нг/мл, цитокинов IL-2 в концентрации 250 МЕ/мл и IL-15 и IL-21 по 20 нг/мл соответственно. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере при 37°C.

15 После активации в присутствии цитокинов НК-клетки начинают пролиферировать с первых часов культивирования и их количество увеличивается до 9 раз уже через 15 часов после начала активации (Фиг. 1). По сравнению с неактивированными клетками данный показатель был выше в 2,5 раза ($p < 0,05$) (Фиг. 2).

20 Доля НК-клеток в смеси культивированных РВМС к 14 дню у большинства доноров возросла почти в 2 раза от исходного количества и составила в среднем $70 \pm 8\%$ от РВМС. В результате сепарации получили очищенную субпопуляцию активированных НК-клеток, среди которых 98% клеток имели фенотип CD3⁻CD16⁺CD56⁺ НК-клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD38, CD69) и поздней активации (NKG2D, HLA-DR). Данные клетки могут быть использованы для адоптивной иммунотерапии онкобольных, а также для изучения цитотоксической активности НК-клеток.

25 Пример 2 Фенотипический анализ активированных после экспансии НК-клеток.

30 В процессе культивирования РВМС, выделенных у онкобольных пациентов, был проведен анализ субпопуляционного состава и маркеров активации лимфоцитов с помощью проточной цитометрии и определения наличия поверхностных маркеров CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD38, CD56, CD69, CD314 и HLA-DR на 0, 7 и 14 35
40
45

Культивирование проводили с изменениями по процедуре, описанной в примере 1. Так, после выделения РВМС сразу культивировали НК-клетки без проведения негативной селекции. При культивировании клеток в среде с IL-2 и IL-15 было выявлено, что в процессе активации происходит незначительное перераспределение клеточных субпопуляций (Фиг. 3). Так процент В- и Т-лимфоцитов незначительно уменьшался к 14 суткам культивирования, доля НКТ-клеток начинала увеличиваться с 7 суток. Количество НК-клеток к 14 суткам возрастает в 1,4 раза. Экспрессия рецептора NKG2D на всех лимфоцитах незначительно увеличилась на 14 сутки культивирования. Процент клеток, несущих рецептор к IL-2 (CD25) максимально возростал в 1,7 раз только к 14 суткам. Экспрессия активационных маркеров увеличилась к 14 дню в 2,3 раза для CD38, в 2,5 раза для HLA-DR и в 3 раза для CD69. Учитывая их функциональные особенности, эти эффекторные клетки могут быть использованы для целей адоптивной иммунотерапии

злокачественных новообразований.

Пример 3 Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности активированных после экспансии НК-клеток.

Для определения функциональной активности активированных НК-клеток проводили оценку пролиферативной, цитотоксической активностей и жизнеспособности клеток. Количество клеток в суспензии определяли с использованием автоматического анализатора жизнеспособности клеток TC20 (BioRad, Сингапур). Как правило, одновременно определяли жизнеспособность клеток методом исключения красителя (трипановый синий) (Trypan Blue Dye 0,1%, Bio-Rad, Великобритания). Для определения количества живых клеток аликвоту суспензии (~10 мкл) смешивают с равным количеством 0,4% (w/v) раствора красителя в PBS. Пролиферативную активность и жизнеспособность культивируемых клеток оценивали каждые 72 ч в течение всего времени культивирования. Результат получали как процент живых и мертвых клеток. Количество клеток в 1 мл суспензии пересчитывали на общий объем культуральной среды.

Оценку кинетики роста клеточной популяции и функциональной активности клеток, культивируемых в 24-луночных планшетах, проводили в режиме реального времени IncuCyte Zoom (Essen Bioscience, США) в течении 65 ч в условиях CO₂-инкубатора.

Каждый час автоматически получали изображение областей наблюдения и количественные характеристики заданных параметров клеточной популяции. Полученные данные обрабатывали с помощью программы IncuCyte Software и получали графики зависимости конфлюентности (т.е. пролиферативную активность, количество живых или мертвых клеток по включению флуорисцентных красителей в зависимости от времени культивирования) НК-клеток от времени наблюдения. По сравнению с неактивированными НК-клетками этот показатель был выше в 2,5 раза (Фиг. 4).

Пример 4 Оценка цитотоксической активности активированных после экспансии НК-клеток

Для постановки цитотоксического теста были использованы стандартные для НК-клеток клетки-мишени линии K-562. Цитолитическую активность НК-клеток оценивали цитофлуориметрически, используя специальный набор, содержащий два вида красителей для живых и мертвых клеток-мишеней (L-3224) "Live/Dead" (Molecular Probes, США). Кальцеин АМ (САМ) окрашивает живые клетки, этидий гомодимер-1 (Ethd-1) проникая в ядро, окрашивает мертвые клетки. Литическую активность НК-клеток против клеток-мишеней оценивали в различных соотношениях. Исходя из количества мишеней (K-562) - 15 тыс. клеток на образец с НК-клетками в соотношении 1:2 и 1:4.

Показано, что при культивировании в среде с комбинацией цитокинов IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 цитотоксическая активность НК-клеток проявляется с первых часов культивирования, т.к. уменьшается количество живых клеток, окрашенных САМ (Фиг. 5), и постепенно возрастает, достигая максимума через 60 часов культивирования. Показано, что цитотоксическая активность выше у активированных НК-клеток (Фиг. 5, 4, 6) при соотношении мишеней и эффекторов 1:20. Если сравнивать показатели у здорового донора и онкологического больного, то можно заметить, что у больного (Фиг. 5 - С, D) цитотоксическая активность меньше, чем у здорового добровольца (Фиг. 5 - А, В), особенно при низком соотношении мишеней и эффекторов.

Пример 5 Оценка секреторной функции НК-клеток после активации *in vitro* в присутствии комбинации цитокинов

Для изучения функциональной активности активированных НК-клеток проводили оценку концентраций цитокинов (включая IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α) в бесклеточном

продукте (супернатанте) на 1, 3 и 5 сутки культивирования с помощью мультипараметрического анализа по протоколу набора MILLIPLEX[®] MAP Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A 48 Plex Premixed Magnetic Bead Panel (Millipore, Merck, США) на приборе Luminex 200 (Merck, США). По стандартным образцам строили калибровочные кривые, по которым вычисляли концентрацию белков в супернатантах. На Фиг. 6 представлены результаты анализа изменения концентраций IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α в динамике у здоровых доноров. Было показано, что концентрация большинства цитокинов в разной степени повышается в динамике наблюдения, что свидетельствует об увеличении цитокинпродуцирующей секреторной функции NK-клеток в процессе их активации.

Литература:

[1] Abakushina E.V. et al., The Advantages and Challenges of Anticancer Dendritic Cell Vaccines and NK Cells in Adoptive Cell Immunotherapy // Vaccines. - 2021. - Т. 9. - №.11. - С. 1363.

(57) Формула изобретения

1. Способ культивирования *in vitro* естественных киллеров (NK-клеток) в питательной среде с комбинацией по меньшей мере двух цитокинов: интерлейкином-2 (IL-2), интерлейкином-15 (IL-15), интерлейкином-18 (IL-18), интерлейкином-21 (IL-21) и фидерными клетками, включающий этапы:

(а) добавление в питательную среду NK-клеток, выделенных из мононуклеарных клеток (РВМС) периферической крови человека в концентрации от 1×10^5 до 1×10^6 на 1 мл питательной среды;

(b) добавление интерлейкинов в питательную среду;

(с) добавление в среду фидерных клеток в соотношениях от 1:1 до 1:10;

при этом весь процесс культивирования NK-клеток составляет 14-21 суток, в течение которого замену питательной среды проводят каждые 2-5 суток от начала культивирования, отличающийся тем, что в качестве питательной среды используют RPMI-1640, на этапе (b) интерлейкины добавляют в питательную среду, начиная с 0 суток, на этапе (с) начинают на 5-8 сутки, а в качестве фидерных клеток используют одну из генетически модифицированных линий K562-mb15-41BBL или K562-mb21-41BBL, культивирование проводят в мультигазовом инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ или 5% CO₂ и 5-10% O₂.

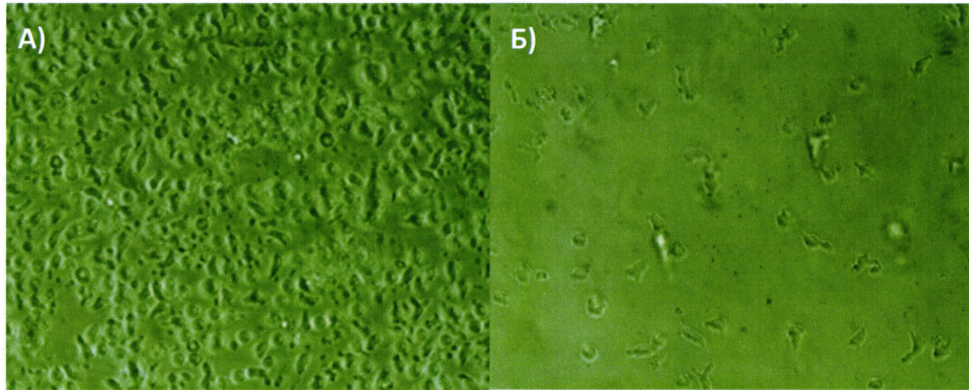
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для питательной среды дополнительно используют одну из следующих составляющих: эмбриональную бычью сыворотку (FBS), альбумин человека, заменитель сыворотки NU-SERUM или их аналоги в концентрации 5-10%.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что интерлейкины (IL-2, IL-15, IL-18, IL-21) используют в концентрации 0,1-500 нг на 1 мл питательной среды.

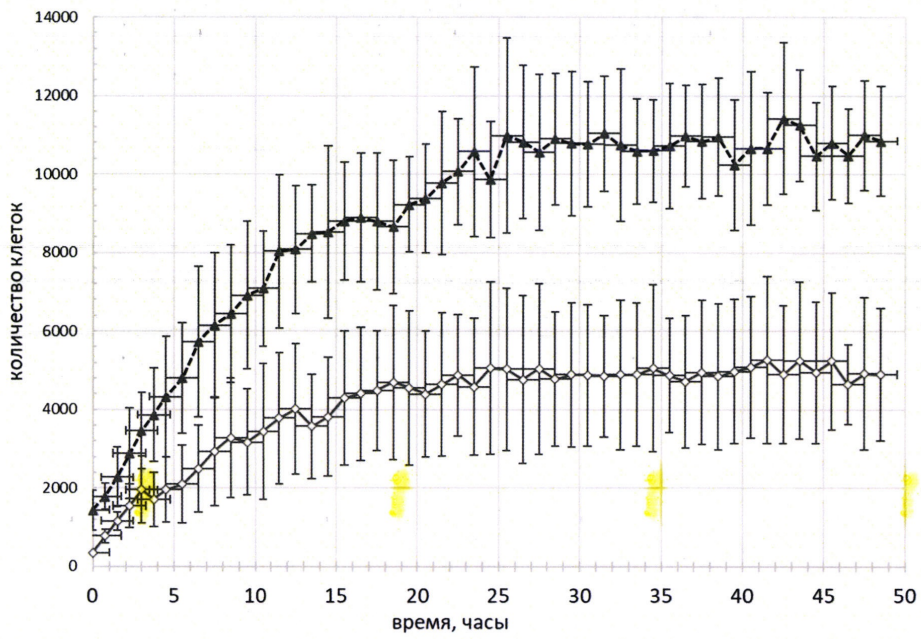
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для питательной среды дополнительно используют моноклональные антитела anti-CD3 и/или anti-CD16 в концентрации 0,1-50 нг/мл.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что проводят определение жизнеспособности, количества и функциональной активности NK-клеток в составе РВМС при каждой замене питательной среды.

1

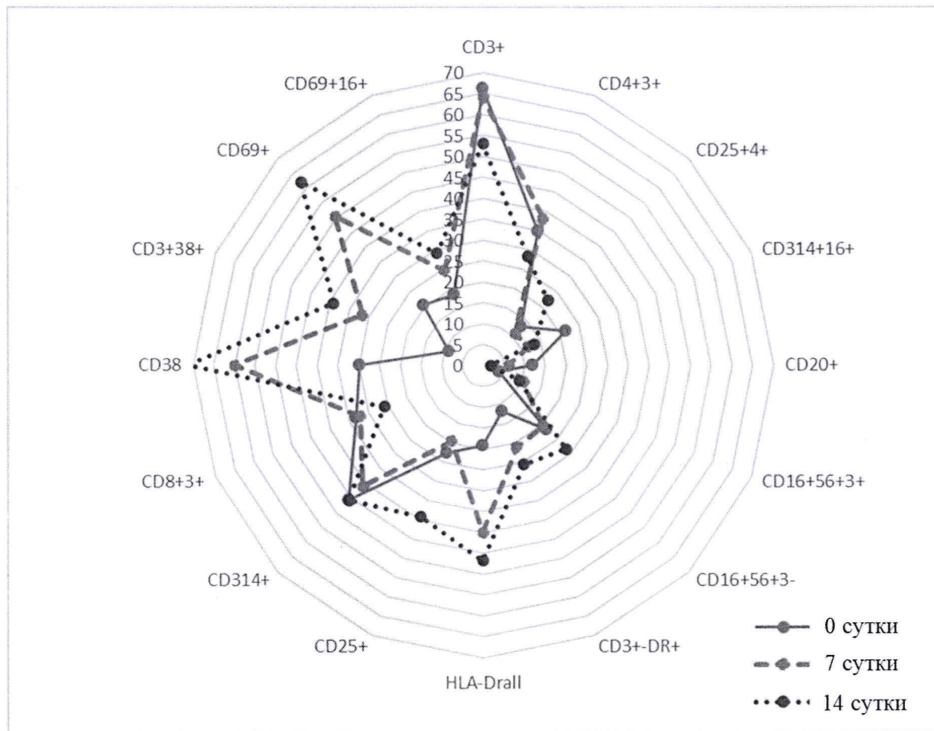


Фиг.1

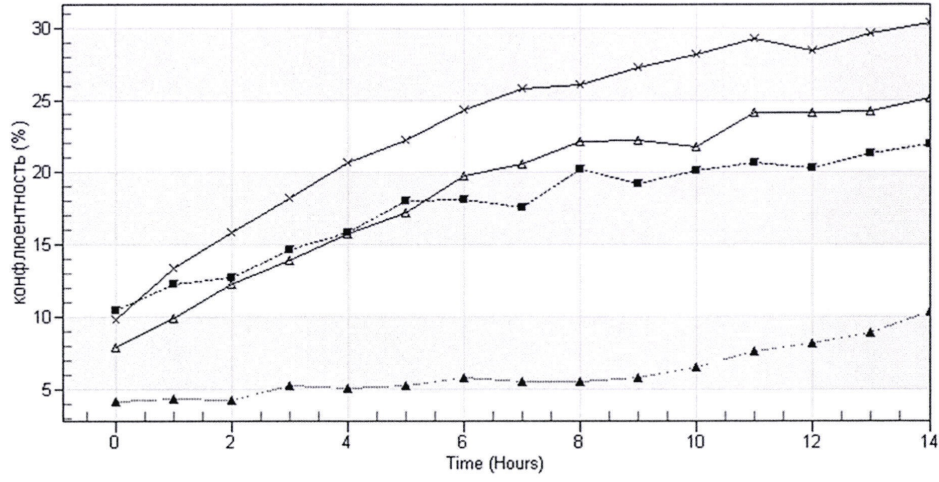


Фиг.2

2

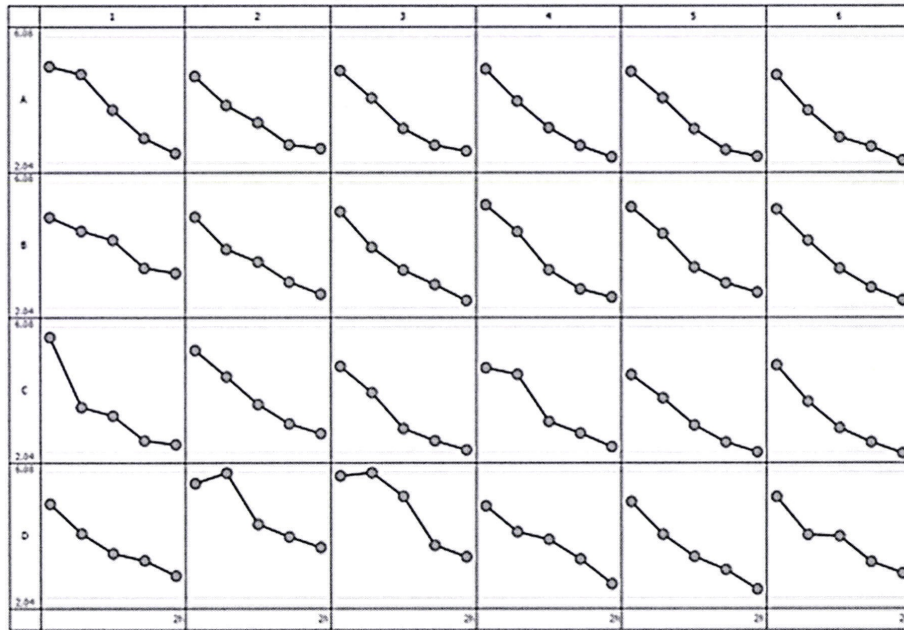


Фиг.3

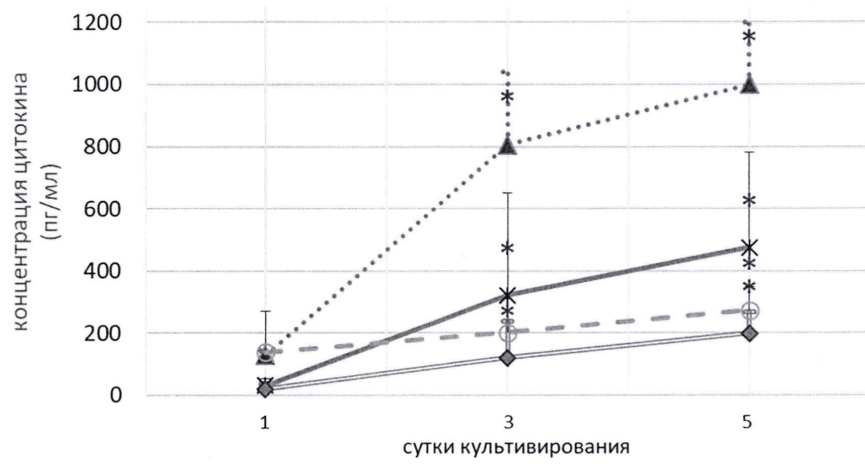


Фиг.4

Cytotoxicity - All Wells Mean vs Time
Uncorrected Green Image Sharpness (sharpness units) over 2 hours



Фиг.5



Фиг.6