УДК 576.535-044.62:57.085.3]:616-018-097.3

ЭКСПАНСИЯ И АКТИВАЦИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *ЕХ VIVO* В ПРИСУТСТВИИ ТРАНСГЕННЫХ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

© 2020 г. Е. П. Вашкевич¹, А. А. Мигас^{1, *}, А. Н. Мелешко¹, М. А. Матвеенко¹, Н. В. Струшкевич², Т. В. Шман¹

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, 223053 Беларусь ²Сколковский институт науки и технологий, Территория Инновационного Центра "Сколково", Москва, 121205 Россия

**E-mail: alexandr.migas@gmail.com* Поступила в редакцию 18.12.2019 г. После доработки 13.01.2020 г. Принята к публикации 15.01.2020 г.

Согласно предварительным результатам клинических испытаний, использование активированных и экспансированных *ex vivo* естественных киллерных клеток является перспективным направлением адоптивной иммунотерапии острого миелоидного лейкоза, а также ряда солидных опухолей при совместном применении с таргетными моноклональными антителами. Однако внедрение данного подхода в клиническую практику ограничено возможностью получения достаточного количества ЕК-клеточного продукта с заданными характеристиками. Для решения этой проблемы мы получили трансгенные фидерные клетки на основе иммортализованной клеточной линии K562, экспрессирующие рекомбинантный мембраносвязанный вариант интерлейкина-21 человека и белок 4-1BBL. Совместное культивирование мононуклеарных клеток, полученных из материала периферической крови 10 здоровых доноров, с клетками полученной генетически модифицированной фидерной культуры приводило к значительному приросту естественных киллерных клеток (медиана – в 21589 раз, минимум – 3150 раз, максимум – 304328 раз) с минимальным содержанием Т-клеток (медиана – 0.5%, минимум – 0.06%, максимум – 4.7%) по сравнению с их исходным содержанием до начала культивирования. Полученные таким способом ЕК-клетки не содержали контаминации онкогеном *BCR-ABL1* от фидерных клеток и имели более низкую экспрессию протоонкогена *с-MYC* по сравнению с исходным уровнем.

Ключевые слова: естественные киллерные клетки, экспансия и активация *ex vivo*, адоптивная противоопухолевая иммунотерапия, генно-инженерные фидерные клетки **DOI:** 10.31857/S0041377120040070

Естественные киллерные (ЕК) клетки представляют собой популяцию лимфоцитов врожденного звена иммунитета, принимающих активное участие в формировании противоопухолевого и противовирусного иммунного ответа (Kiessling et al., 1975; Pross et al., 1975; Timonen et al., 1980). Они образуются в костном мозге в процессе дифференцировки из общего предшественника лимфоцитов. Дальнейшее созревание и функциональная активность наблюдаются преимущественно в периферической крови и лимфатических узлах (Kondo et al., 1997; Carotta et al., 2011; Fathman et al., 2011; Sojka et al., 2014; Constantinides et al., 2015). Высокая цитотоксическая активность ЕК-клеток в отношении малигнизированных клеток различного происхождения является основанием для использования данной группы лимфоцитов в адоптивной терапии онкологических заболеваний. Получение достаточного количества клеточного продукта, характеризующегося необходимой чистотой и степенью активации ЕК-клеток, является одним из основных условий эффективного применения этой технологии.

Использование ЕК-клеток в терапевтических целях ограничивается сложностью получения чистой популяции этих клеток, так как их содержание среди лимфоцитов в периферической крови составляет 5— 15%. В настоящее время наиболее широко используемым подходом к получению ЕК-клеток является их селекция из периферической крови с последующей активацией и экспансией в присутствии цитокинов интерлейкина (ИЛ) 2 или 15. Данный метод в раз-

Принятые сокращения: ЕК – естественные киллерные клетки; ЕКТ – ЕК-подобные Т-клетки; ИЛ – интерлейкин; мИЛ – мембраносвязанный рекомбинантный вариант интерлейкина; кДНК – комплементарная ДНК, синтезированная на матрице РНК; ФК – фидерные клетки; МНК – мононуклеарные клетки; мРНК – матричная РНК; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

личных вариациях позволяет добиться прироста в 3— 300 раз и получить высокоочищенный продукт активированных ЕК-клеток в количестве до 1×10^{10} (Cheng et al., 2013). Недостатками такого подхода является необходимость изолировать ЕК-клетки методом магнитной сепарации, что значительно увеличивает стоимость процедуры, и недостаточное количество получаемых ЕК-клеток для эффективного терапевтического применения.

В последние годы были разработаны альтернативные методы экспансии с использованием культуры генно-инженерных фидерных клеток (ФК) человека, несущих на своей поверхности ряд молекул, стимулирующих пролиферацию и активацию ЕКклеток ex vivo. Пионером в этой области выступает исследовательская группа д-ра Dario Campana (St. JudeChildren's Research Hospital, США). Согласно предложенному ими подходу, в качестве стимуляторной используется иммортализованная клеточная линия хронического миелоидного лейкоза человека К-562, генетически модифицированная для экспрессии молекул 4-1BBL и мембраносвязанного варианта ИЛ-15 (мИЛ-15) (Imai et al., 2005). В качестве альтернативы может быть использован мембраносвязанный вариант цитокина ИЛ-21 (мИЛ-21), что позволяет достичь еще более высоко уровня экспансии ЕК-клеток (Denman et al., 2012).

Цель нашего исследования — разработка метода получения функционально активных ЕК-клеток человека в количестве, необходимом для их применения в качестве терапевтического средства (далее - клеточный продукт). Новизна метода состоит в создании и применении генетически-модифицированных вариантов ФК для *ex vivo* экспансии и активации ЕКклеток человека. В процессе реализации работы предполагалось решить следующие задачи: 1) получить генетически-модифицированные варианты клеточной линии К-562 с эктопической экспрессией рекомбинантных мембраносвязанных цитокинов ИЛ-15 и ИЛ-21, а также полноразмерного белка 4-1BBL человека; 2) оценить эффективность экспансии и активации ex vivo EK-клеток человека в присутствии разработанных генно-инженерных клеточных линий; оценить безопасность полученного продукта – ЕКклеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение генно-инженерных фидерных клеточных линий. Исходная клеточная линия К-562 (АТСС ССL-243) хронического миелоидного лейкоза человека была тандемно трансдуцирована лентивирусными частицами с целью создания стабильно модифицированных вариантов, экспрессирующих два из трех трансгенов: полноразмерную кДНК гена 4-1BBL человека, а также рекомбинантные цитокины мИЛ-15 и мИЛ-21. Мембраносвязанные варианты цитокинов человека были сконструированы путем включения зрелого полипептида каждого цитокина в ген

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

CD8A с замещением цитокином внеклеточной последовательности гена *CD8A*, но с сохранением его сигнального пептида и трансмембранного домена. Полученные конструкции были клонированы в трансфер-плазмиду pWPXL, которую использовали для наработки рекомбинантных лентивирусных частиц. Трансдукция клеток линии К-562 проводилась с множественностью инфекции равной 5. Для получения дочерних клеточных культур с максимальным уровнем экспрессии вводимых трансгенов использовали метод сортировки флуоресцентно-активированных клеток на приборе FACSVantage SE (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител к ИЛ-15, ИЛ-21 (RnD Systems, США) и 4-1BBL (Becton Dickinson, США).

Экспансия и активация ЕК-клеток *ех vivo*. Исходным материалом для экспансии являлись МНК, выделенные из ПК 10 здоровых доноров методом градиентного центрифугирования. Метод экспансии состоял в создании условий, при которых активно пролиферируют только ЕК-клетки, что достигалось добавлением в культуру МНК полученных нами генетически-модифицированных ФК. Исследовали четыре варианта культивирования МНК: без добавления ФК (далее обозначен как контроль); с добавлением в качестве ФК клеток немодифицированной линии К-562; с добавлением ФК, экспрессирующих рекомбинантные белки 4-1BBL и мИЛ-15 (FD15); с добавлением ФК, экспрессирующих рекомбинантные белки 4-1BBL и мИЛ-21 (FD21).

Для подавления пролиферации самих ФК их предварительно облучали в дозе 100 Гр. Стимуляцию пролиферации ЕК-клеток с помощью ФК осуществляли трижды: в начале экспансии (сутки 0) ФК добавляли к МНК в соотношении 2 : 1, а на 7- и 14-е сутки – 1 : 1. Культивирование проводили в полной ростовой среде RPMI-1640 (Gibco, США), содержащей ИЛ-2 (препарат Ронколейкин, ООО НПК БИОТЕХ, РФ) в конечной концентрации 50 МЕ/мл. Продолжительность экспансии составляла 21 сут.

Количество и популяционный состав полученных клеток оценивали до начала (0 сут), на 7-, 14- и 21-е сутки экспансии. Прирост клеток рассчитывали еженедельно как отношение абсолютного количества ЕК-клеток в экспансированной культуре к их исходному количеству в образце МНК до начала экспансии.

Иммунофенотипический анализ. Выполняли методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Весктап Coulter, США). Для оценки популяционного состава клеточных продуктов использовали моноклональные антитела к поверхностным антигенам CD3, CD56, CD69, NKp44 (CD336) (Весton Dickinson, США, Весктап Coulter, США). Субпопуляции выделяли по следующему фенотипу: Т-лимфоциты – CD3⁺CD56⁻, ЕК-клетки – CD3⁻CD56⁺, ЕКТ-клетки – CD3⁺CD56⁺. Активацию ЕК-клеток оценивали по дополнительной экспрессии специ-

ВАШКЕВИЧ и др.

Ген	Последовательность 5'-3'	
<i>cMYC</i> _F	CCTGGTGCTCCATGAGGAGA	
<i>cMYC</i> _R	GCCTGCCTCTTTTCCACAGA	
<i>cMYC</i> _Pr	FAM-ACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGAAC-BHQ	
<i>hTERT</i> _F	TACGTCGTGGGAGCCAGAAC	
hTERT_R	CCTTCACCCTCGAGGTGAGA	
<i>hTERT</i> _Pr	FAM-TTCCGCAGAGAAAAGAGGGCCGA-BHQ	
<i>BCR/ABL</i> _F	CTGGCCCAACGATGGCGA	
<i>BCR/ABL_</i> R	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA	
<i>BCR/AB</i> _Pr	FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-BHQ	
GUS_F	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	
GUS_R	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA	
GUS_Pr	FAM-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-BHQ	

|--|

фических маркеров активации – CD69⁺, NKp44⁺. Обработку полученных результатов проводили с использованием программы CXP Analysis (Beckman Coulter, США).

Оценка цитотоксической активности ЕК-клеток. В качестве клеток-мишеней использовали иммортализованные культуры клеток К-562 (ATCC CCL-243, хронический миелоидный лейкоз) и Raji (ATCC CCL-86, лимфома Беркитта), трансдуцированные геном флуоресцентного белка GFP, в качестве эффекторов – экспансированные ЕК-клетки на 21-е сут культивирования. Соотношение эффектор : мишень составляло 1:1, 5:1 и 10:1. Цитотоксический тест проводили в течение 1 ч, в качестве витального красителя использовали 7AAD (Beckman Coulte, США). Клетки-мишени выделяли по флуоресценции GFP, а количество погибших клеток определяли по окрашиванию 7AAD. Цитотоксичность ЕК-клеток выражали долей (%) погибших клеток-мишеней. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре.

Анализ экспрессии генов на уровне мРНК. Определение транскриптов химерного онкогена *BCR-ABL1*, характерного для линии K-562, а также уровни экспрессии транскриптов генов *cMYC* и *hTERT* оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени. Нормализацию проводили по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *GUS*. ПЦР выполняли с использованием пары праймеров и ТаqMan-зонда на каждый ген (табл. 1). Праймеры и зонды подбирали самостоятельно, синтез осуществлялся по заказу (ООО Праймтех, Беларусь). Метод расчета результатов – дельта Сt. Материалом для анализа являлась кДНК, полученная из МНК донора до начала экспансии и соответствующего EK-клеточного продукта на 21-е сут экспансии.

Выделение РНК осуществляли набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с протоколом производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя.

Статистическая обработка результатов. Данные на диаграммах и графиках представлены в виде среднего значения и среднеквадратичного отклонения. Для оценки достоверности различий в группах использовали U-критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генно-инженерные фидерные клеточные линии. В ходе проведенной работы нами было получено два варианта генетически-модифицированных ФК на основе К-562: сублиния FD15, экспрессирующая рекомбинантные белки 4-1BBL и мИЛ-15, и сублиния FD21, экспрессирующая рекомбинантные белки 4-1BBL и мИЛ-21.

Экспрессия введенных трансгенов была подтверждена как на уровне мРНК методом количественной ПЦР (рис. 1*a*), так и на уровне белковых продуктов методом проточной цитометрии (рис. 1 δ , δ).

Стабильность экспрессии введенных трансгенов в ΦK оценивали методом проточной цитометрии на протяжении двух мес в культуре клеток *in vitro*. В результате не было отмечено потери или снижения экспрессии анализируемых белков. Стабильное встраивание вводимых трансгенов в геном исходной линии K-562, а также копийность провирусных геномов в полученных дочерних клеточных линиях оценивали методом количественной ПЦР на матрице ДНК соответствующих образцов. Было определено, что для варианта FD15 среднее число копий провируса на клетку составляет 5.34, для FD21 – 6.9.

Эффективность экспансии ЕК-клеток *ex vivo*. На данном этапе экспериментально оценивали эффективность использования генно-инженерных фидерных линий FD15 и FD21 с целью получения ЕК-кле-



Рис. 1. Экспрессия вводимых трансгенов в полученных генно-инженерных клеточных линиях. Экспрессию на уровне мРНК (*a*) оценивали с помощью ОТ-ПЦР с нормализацией по контрольному гену *GUS*. Позитивная экспрессия белков 4-1BBL и мембраносвязанного рекомбинантного варианта ИЛ1-5 (мИЛ-15) подтверждена на поверхности полученных клеток FD15 (*б*, квадрант G2), экспрессия 4-1BBL и мИЛ-21 – на FD21 (*в*, квадрант D++) методом проточной цитометрии.

точного продукта с высокой степенью активации и оптимальным популяционным составом.

Согласно полученным данным, на 21-е сут культивирования наблюдали значимый прирост популяции ЕК-клеток как в случае использования в качестве ФК исходной клеточной линии К-562 (медиана – в 204 раза, минимум – в 17 раз, максимум – в 11017 раз), так и ее генно-инженерных производных FD15 (медиана – в 371 раз, минимум – в 150 раз, максимум – в 26473 раза) и FD21 (медиана – в 21590 раз, минимум – в 3151 раз, максимум – в 304328 раз). Однако наибольшего прироста ЕК-клеток (*P* < 0.05) достигали при использовании варианта фидерной культуры FD21 (рис. 2). При условии культивировании МНК без ФК значимого прироста ЕК-клеток не наблюдали.

Наибольший прирост ЕК-клеток при использовании FD21 по сравнению с FD15 объясняется особенностями внутриклеточного сигналинга, развивающегося в лимфоцитах под воздействием цитокинов с общей γ-цепью рецептора. В присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 в развитии сигнального каскада JAK/STAT преимущественно участвует белок STAT5, тогда как под воздействием ИЛ-21 аналогичную роль выполняет белок STAT3, который является активатором транскрипции гена каталитического компонента те-



Рис. 2. Исследовали четыре варианта экспансии: без добавления ФК (контроль); с добавлением ФК немодифицированной линии К-562 (К-562); с добавлением ФК, экспрессирующих рекомбинантные белки 4-1BBL и мИЛ-15 (FD15); с добавлением ФК, экспрессирующих рекомбинантные белки 4-1BBL и мИЛ-21 (FD21). Прирост клеток рассчитывали на 0-, 7-, 14- и 21-е сут. Здесь и на рис. 3–6: для каждой группы (n = 10) приведены значения среднего и стандартные отклонения.



Рис. 3. Экспрессия гена *hTERT*. Экспрессию оценивали в ЕК-клетках, полученных на 21-е сут в разных условиях экспансии (группы аналогичны таковым на рис. 2), в сравнении с его исходным уровнем в популяции МНК на 0 сут методом ОТ-ПЦР с нормализацией по контрольному гену *GUS*.

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

ломеразы (*hTERT*) (Konnikova et al., 2005). Нами было выявлено, что экспрессия гена *hTERT* значительно возрастала (P < 0.05) по сравнению с исходным уровнем (до начала экспансии) при стимуляции фидерной культурой FD21 и существенно снижалась (P < 0.05) при стимуляции вариантом FD15 (рис. 26). Полученные результаты согласуются с данными из литературы, отражающими динамику длинны теломер в EK-клетках под воздействием ИЛ-15 или ИЛ-21 (Denman et al., 2012).

Популяционный состав клеточного продукта оценивали методом проточной цитометрии. В исходной фракции МНК (0 сут) основную часть клеток составляли Т-лимфоциты (41.3-77.0%), тогда как EK- (8.0-30.0%) и EKT-клетки (1.7-16.5%) были прелставлены в меньшей степени. Экспансия МНК без ФК через 21 сут не приводила к значительному приросту клеток и не изменяла исходный субпопуляционный состав. Для всех вариантов ФК значительное повышение доли ЕК-клеток наблюдали уже на 7-е сут культивирования (в среднем больше 60%), на 14-е сут – больше 90%. Тем не менее, на 21-е сут культивирования максимальное содержание ЕК-клеток (CD3-CD56⁺) при минимальном содержании Т- (CD3⁺CD56⁻) и ЕКТ-клеток (CD3⁺CD56⁺) наблюдали при использовании варианта FD21в качестве стимуляторной линии (рис. 4).

Следует отметить, что в качестве исходного материала мы использовали популяцию МНК, не подвергшуюся предварительной селекции или деплеции. Тем не менее, применение ФК позволило не только обеспечить экспансию (прирост количества клеток), но и добиться высокой степени обогащения конечного клеточного продукта ЕК-клетками. Таким образом, описываемая технология позволяет добиться избирательной экспансии ЕК-клеток по ряду факторов. Во-первых, сама по себе линия К-562 является потенциальным активатором ЕК-клеток благодаря сниженному уровню экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости 1 класса (Сіurea et al., 2017). Во-вторых, невысокие дозы ИЛ-2 (50 МЕ/мл), поддерживая жизнеспособность экспансируемой популяции лимфоцитов, являются недостаточными для запуска активной пролиферации Т-лимфоцитов. В-третьих, репертуар активационных лигандов на поверхности клеток полученных нами фидерных линий позволяет эффективно стимулировать экспансию и активацию именно ЕКклеток вследствие их способности формировать многочисленные иммунные синапсы с потенциальными мишенями.

Активация и цитотоксическая активность экспансированных *ex vivo* ЕК-клеток. Активацию оценивали по уровням экспрессии поверхностных белков CD69 и NKp44 методом проточной цитометрии (рис. 5*a*). Согласно полученным результатам, на 21-е сутки экспансии уровень активации ЕК-клеток при использовании обоих вариантов ФК – FD15 и FD21 –



Рис. 4. Характеристика популяционного состава. Представлено содержание T-, EK- и EKT-клеток методом проточной цитометрии на 0- и 21-е сут в разных условиях экспансии (группы аналогичны таковым на рис. 2). Для каждой группы (n = 10) приведены значения среднего и стандартные отклонения.

превышал значения исследуемых параметров в исходной популяции МНК доноров (P < 0.05). Аналогичные значения активации ЕК-клеток были выявлены и в случае применения немодифицированной линии K-562, а также в варианте культивирования без использования ФК. Высокую долю ЕК-клеток, экспрессирующих CD69 и NKp44, наблюдали на всем протяжении культивирования для всех вариантов экспансии.

Противоопухолевую активность ЕК-клеток, экспансированных в присутствии FD21, оценивали в прямом цитотоксическом тесте (рис. 46) по отношению к модельным клеточным линиям К-562 и Raji. Высокая цитотоксическая активность полученного клеточного продукта, наблюдаемая даже при минимальном соотношении эффектор : мишень (1 : 1), свидетельствует о существенном противоопухолевом потенциале ЕК-клеток, подвергшихся активации и экспансии с использованием генно-инженерных ФК.

Параметры безопасности конечного ЕК-клеточного продукта. Согласно используемому в данном исследовании протоколу экспансии, ФК перед введением в совместную культуру с МНК донора подвергали облучению в дозе 100 Гр. Данная процедура исключает возможность контаминации конечного продукта иммортализованными опухолевыми клетками. Для достоверности мы оценили наличие транскриптов химерного онкогена *BCR-ABL1*, экспрессирующегося в клетках линии K-562 и ее производных FD15 и FD21, методом количественной ПЦР в режиме реального времени. В результате, ни в одном из образцов конечного клеточного продукта на 21-е сут



Рис. 5. Активация и функциональная активность экспансированных *ex vivo* EK-клеток. Оценивали поверхностную экспрессию маркеров активации CD69 и NKp44 методом проточной цитометрии на 0- и 21-е сут в разных условиях экспансии (группы аналогичны таковым на рис. 2) (*a*). Цитотоксическую активность в отношении клеток-мишеней K-562 и Raji оценивали для EK-клеточного продукта, полученного на 21-е сут в присутствии FD21.



Рис. 6. Уровень транскриптов *BCR-ABL1* и *cMYC* в конечном клеточном продукте. Оценивали с помощью OT-ПЦР на матрице мРНК с нормализацией по контрольному гену *GUS*. Уровень транскриптов химерного онкогена *BCR-ABL1* (*a*) определяли во всех вариантах клеточных продуктов, в качестве положительного контроля использовали материал FD21. OEФ – отн. ед. флуоресценции. Экспрессию гена *cMYC* (б) определяли на 0- и 21-е сут в разных условиях экспансии (группы аналогичны таковым на рис. 2).

экспансии не было обнаружено признаков возможной контаминации (рис. 6*a*).

Опухолевая трансформация клеток донора в результате непродолжительной стимуляции культурой Φ K также маловероятна. Тем не менее, нами были проанализированы уровни экспрессии гена *сМYC*, сверхэкспрессия которого зачастую наблюдается в процессе неопластической трансформации, методом количественной ПЦР в реальном времени (рис. 66). Согласно полученным данным, экспрессия гена *сМYC* при стимуляции культуры донорских лимфоцитов ФК снижалась. Использование ЕК-клеток в целях адоптивной иммунотерапии было длительное время ограничено отсутствием эффективных протоколов их активации и экспансии *ex vivo*. Метод иммуномагнитной сепарации целевой популяции, получивший широкое распространение в клинической практике, позволяет получить чистую популяцию ЕК-клеток, однако, является достаточно дорогостоящим подходом. Тем не менее, предварительные данные, полученные в ходе многочисленных клинических испытаний, свидетельствуют о потенциальной эффективности использования ЕК-клеток в терапии острого миелоидного лейкоза (Anderson et al., 2011; Boyiadzis et al., 2017; Fehniger et al., 2018; Jaiswal et al., 2017), а также

263

при совместном применении с таргетными моноклональными антителами в лечении широкого спектра злокачественных новообразований (Beano et al., 2008; Cheng et al., 2013; Lattanzio et al., 2017; Lo Nigro et al., 2016). При этом эффективность терапии достигается введением высоких доз ЕК-клеток. Вариант экспансии и активации, описанный в данной работе, позволяет добиться значительного прироста целевой популяции из небольшого количества материала периферической крови донора без предварительной селекции. Более того, протокол экспансии не предусматривает использование специализированных дорогостоящих питательных сред и добавок, что существенно снижает конечную стоимость продукта и делает его более доступным для пациента, а также расширяет арсенал полходов в борьбе онкологическими заболеваниями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Республики Беларусь в рамках Государственной программы "Наукоемкие технологии и техника" (проект № 02.2017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с использованием животных. Периферическую кровь забирали у здоровых доноров с получением информированного согласия для иммунологических исследований, утвержденного в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

К.П. Вашкевич: активация и экспансия ЕК-клеток *in vitro*, постановка функциональных тестов, иммунофенотипирование; А.А. Мигас: получение генетически модифицированных клеточных линий; А.Н. Мелешко: сборка генетических конструкций, молекулярное клонирование; М.А. Матвеенко: активация и экспансия ЕК-клеток *in vitro*; Н.В. Струшкевич: дизайн структуры рекомбинантных мембраносвязанных вариантов цитокинов; Т.В. Шман: активация и экспансия ЕК-клеток *in vitro*, постановка функциональных тестов, иммунофенотипирование Е.П. Вашкевич, А.А. Мигас, А.Н. Мелешко, Т.В. Шман – написание и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Alderson K.L., Sondel P.M. 2011. Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. J. Biomed. Biotechnol. V. 2011. Article 379123. https://doi.org/10.1155/2011/379123

- Beano A., Signorino E., Evangelista A., Brusa D., Mistrangelo M., Polimeni M.A., Spadi R., Donadio M., Ciuffreda L., Matera L. 2008. Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. J. Transl. Med. V. 6. P. 25.
- Boyiadzis M., Agha M., Redner R. L., Sehgal A., Im A., Hou J.Z., Farah R., Dorritie K. A., Raptis A., Lim S. H., Wang H., Lapteva N., Mei Z., Butterfield L.H., Rooney C.M., Whiteside T.L. 2017. Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. Cytotherapy. V. 19. P. 1225.
- *Carotta S., Pang S.H., Nutt S.L., Belz G.T.* 2011. Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. Blood. V. 117. P. 5449.
- Cheng M., Chen Y., Xiao W., Sun R., Tian Z. 2013. NK cellbased immunotherapy for malignant diseases. Cell. Mol. Immunol. V. 10. P. 230.
- Ciurea S.O., Schafer J.R., Bassett R., Denman C.J., Cao K., Willis D., Rondon G., Chen J., Soebbing D., Kaur I., Gulbis A., Amed S., Rezvani K., Shpall E.J., Lee D.A., Champlin R.E. 2017. Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. Blood. V. 130. P. 1857.
- Constantinides M.G., Gudjonson H., McDonald B.D., Ishzuka I.E., Verhoef P.A., Dinner A.R., Bendelac A. 2015. PLZF expression maps the early stages of ILC1 lineage development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 112. P. 5123.
- Denman C.J., Senyukov V.V., Somanchi S.S., Phatarpekar P.V., Kopp L.M., Johnson J.L., Singh H., Hurton L., Maiti S.N., Huls M.H., Champlin R.E., Cooper L.J., Lee D.A. 2012. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. PLoS One. V. 7. Article e30264.

https://doi.org/10.371/journal.pone.0030264

- Fathman J.W., Bhattacharya D., Inlay M.A., Seita J., Karsunky H., Weissman I.L. 2011. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. Blood. V. 118. P. 5439.
- Fehniger T.A., Miller J.S., Stuart R.K., Cooley S., Salhotra A., Curtsinger J., Westervelt P., DiPersio J.F., Hillman T.M., Silver N., Szarek M., Gorelik L., Lowdell M.W., Rowinsky E. 2018. A phase 1 trial of CNDO-109-activated natural killer cells in patients with high-risk acute myeloid Leukemia. Biol. Blood. Marrow. Transplant. V. 24. P. 1581.
- *Imai C., Iwamoto S., Campana D.* 2005. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. Blood. V. 106. P. 376.
- Jaiswal S. R., Zaman S., Nedunchezhian M., Chakrabarti A., Bhakuni P., Ahmed M., Sharma K., Rawat S., O'donell P., Chakrabarti S. 2017. CD56-enriched donor cell infusion after post-transplantation cyclophosphamide for haploidentical transplantation of advanced myeloid malignancies is associated with prompt reconstitution of mature natural killer cells and regulatory T cells with reduced incidence of acute graft versus host disease: a pilot study. Cytotherapy. V. 19. P. 531.
- Kiessling R., Klein E., Pross H., Wigzell H. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. Eur. J. Immunol. V. 5. P. 117.

- Kondo M., Weissman I. L., Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell. V. 91. P. 661.
- Konnikova L., Simeone M.C., Kruger M.M., Kotecki M., Cochran B.H. 2005. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. Cancer Res. V. 65. P. 6516.
- *Lanier L.L.* 1998. NK cell receptors. Annu. Rev. Immunol. V. 16. P. 359.
- Lattanzio L., Denaro N., Vivenza D., Varamo C., Giuliana S., Fortunato M., Chmorey E., Comino A., Monteverde M., Lo Nigro C., Milano G., Merlano M. 2017. Elevated basal antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and high epidermal growth factor receptor (EGFR) expression predict favourable outcome in patients with locally advanced

head and neck cancer treated with cetuximab and radiotherapy. Cancer. Immunol. Immunother. V. 66. P. 573.

- Lo Nigro C., Ricci V., Vivenza D., Granetto C., Fabozzi T., Miraglio E., Merlano M.C. 2016. Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. World J. Gastroenterol. V. 22. P. 6944.
- Pross H.F., Jondal M. 1975. Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. V. 21. P. 226.
- Sojka D.K., Tian Z., Yokoyama W.M. 2014. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. Semin. Immunol. V. 26. P. 127.
- *Timonen T., Saksela E.* 1980. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. J. Immunol. Methods. V. 36. P. 285.

HUMAN NATURAL KILLER CELLS EXPANSION AND ACTIVATION EX VIVO IN THE PRESENCE OF TRANSGENIC FEEDER CELL LINES

E. P. Vashkevich^{*a*}, A. A. Migas^{*a*}, *, A. N. Meleshko^{*a*}, M. A. Matveyenka^{*a*}, N. V. Strushkevich^{*b*}, and T. V. Shman^{*a*}

^aBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, 223053, the Republic of Belarus ^bSkolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

*e-mail: alexandr.migas@gmail.com

The most promising results of clinical trials on adoptive immunotherapy with expanded and activated *ex vivo* natural killer (NK) cells were obtained for acute myeloid leukemia, as well as solid tumors when combined with targeted antibodies treatment. Widespread clinical implementation of this approach is limited by the possibility of obtaining a sufficient amount of an NK cells' product of required quality. In our study, we generated transgenic feeder cells based on the immortalized K-562 line expressing the recombinant membrane-bound variant of interleukin (IL)-21 and 4-1BBL protein. Co-cultivation of peripheral blood mononuclear cells from 10 healthy donors with that genetically modified feeder cells resulted in notable expansion of NK cells (median—21589 times, min—3150 times, max—304328 times) with a minimum content of T-cells (median—0.5%, min—0.06%, max—4.7%). The expanded NK cell product did not contain *BCR-ABL1* contamination from feeder cells and had a lower expression of *c-MYC* proto-oncogene as compared to the initial PBMC level.

Keywords: natural killer cells, expansion and activation *ex vivo*, adoptive antitumor immunotherapy, genetically-engineered feeder cells