

На правах рукописи



Фёдорова Полина Олеговна

**Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров
и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации
химерным рецептором CAR**

3.2.7. Иммунология

1.5.10. Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова»

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Маркушин Станислав Георгиевич

кандидат биологических наук

Чикилева Ирина Олеговна

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач России, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей

Носик Дмитрий Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, заведующий лабораторией противовирусных и дезинфекционных средств «Института вирусологии им. Д.И.Ивановского»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск

Защита состоится «22» сентября 2026 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.173.01 при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова по адресу: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и на сайте <https://instmech.ru/ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Мурзина Алёна Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания представляют собой опасную группу неинфекционных заболеваний, распространенных по всему миру и являющихся одной из ведущих причин смертности среди населения. На сегодняшний день одним из самых перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний является иммунотерапия, к которой относятся терапия опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами, терапия на основе химерного рецептора антигена (CAR), а также использование ингибиторов иммунных контрольных точек или противоопухолевых вакцин [Igarashi et al., 2020].

CAR-терапия основана на получении активированных и генетически модифицированных клеток иммунной системы, которые экспрессируют химерный рецептор антигена, что необходимо для опухолевого распознавания и реализации противоопухолевого иммунитета. CAR-рецепторы наделяют лимфоциты антиген-специфическим распознаванием, активацией и пролиферацией независимо от главного комплекса гистосовместимости. Изначально при разработке CAR-технологии в качестве иммунных клеток-эффекторов использовались Т-лимфоциты. Однако сейчас многие отечественные и зарубежные исследователи фокусируют свое внимание на натуральных киллерах (НК-клетках), поскольку данная популяция обладает существенными преимуществами относительно Т-лимфоцитов: при введении НК-клеток не наблюдается развитие реакции «трансплантат против хозяина» [Pfefferle et al., 2020] и тяжелых токсических реакций [Ebrahimiyan et al., 2022]. Безопасность и эффективность инфузии НК-клеток была продемонстрирована в клинических испытаниях, проводимых на различных моделях онкологических заболеваний [Wang et al., 2024].

Еще одним перспективным подходом к иммунотерапии с использованием генетически модифицированных иммунных клеток является использование CAR-НКТ-клеток. НКТ-клетки, обладающие сходными характеристиками с Т-лимфоцитами и НК-клетками, обладают цитотоксичностью, не вызывают побочных реакций при инфузии, для терапии на основе CAR-НКТ-клеток не требуется тщательного подбора донора [Hadiloo et al., 2023].

Тем не менее, CAR-технология на основе НК- и/или НКТ-клеток пока не получила широкого применения. Существенным препятствием являются трудоемкость и значительные финансовые затраты, связанные с получением клеток данных популяций в достаточном для проведения курса иммунотерапии количестве. Кроме того, не существует единого протокола, разработанного с учетом максимальной эффективности генетической модификации и экспансии CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток: так разные исследовательские группы используют уникальные методики без сравнения результатов их применения относительно других разработанных протоколов.

Степень разработанности темы исследования

С целью получения популяции генетически модифицированных НК-клеток, обладающих высокой эффекторной активностью, в отечественной и зарубежной литературе описаны различные подходы к культивированию и генетическим модификациям. Поскольку применение НКТ-клеток в контексте CAR-терапии является на сегодняшний день малоизученным направлением, то для их обогащения используются те же подходы, что и для экспансии НК-клеток. Так в качестве активаторов деления чаще всего используются сорбированные моноклональные антитела (МАТ) к CD3- и CD28-рецептору, которые, связываясь с Т-клеточным рецептором, стимулируют пролиферацию Т-клеток, активация которых приводит к секреции провоспалительных цитокинов и, как следствие, стимуляции НК-клеток. Поскольку данный метод активации влияет на популяцию НК-клеток лишь косвенно, то возникает необходимость поиска новых стимуляторов пролиферации с целью более эффективного обогащения популяции НК-клеток. Для поддержания жизнеспособности и дальнейшей пролиферации лимфоцитов используются различные цитокины, например, интерлейкин-2 (ИЛ-2), ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, их добавляют в питательную среду в комбинации или по отдельности [Becker et al., 2016]. Для большей пролиферации и поддержания цитотоксической активности ряд исследователей сокультивирует НК-клетки с фидерами, в качестве которых выступают либо другие иммунные клетки, полученные от того же донора или пациента, либо клетки опухолевых линий [Carlsten et al., 2015]. Трансдукция НК-клеток химерным антигенным рецептором возможна различными способами, включающими использование лентивирусных векторов, ретровирусных векторов, электропорации или иных методов [Carlsten et al., 2015]. Однако при всем разнообразии существующих подходов к обогащению НК-клеток на сегодняшний день не существует стандартизированного протокола для экспансии, а количество исследований, направленных на сравнение различных методов, крайне мало. Поэтому для оптимизации процесса производства CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток крайне необходима разработка методики для выделения, активации, экспансии и генетической модификации НК- и НКТ-клеток *in vitro*, включающая в себя преимущества ранее созданных подходов.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является оптимизация метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и повышение эффективности генетической модификации лимфоцитов химерным рецептором CAR.

Реализация цели исследования включает в себя решение следующих **задач**:

1. Оценка влияния ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21 на пролиферацию, выживаемость, экспрессию активационных маркеров НК- и НКТ-клеток при длительном культивировании, а также исследование цитотоксической активности первичной культуры МПК в зависимости от наличия в питательной среде ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21.

2. Изучение воздействия МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, L-фитогемагглютинаина (L-ФГА), конканавалина А (КонаА) и комбинации МАТ + фукозилированный хондроитинсульфат (FCS) на экспансию, выживаемость и экспрессию активационных маркеров НК- и НКТ-клеток, а также на пролиферацию и цитотоксическую активность первичной культуры мононуклеаров периферической крови (МПК).

3. Оптимизация методики использования клеточной линии НЕК 293Т в качестве фидерных клеток для стимуляции деления НК- и НКТ-клеток в первичной лимфоцитарной культуре.

4. Повышение эффективности получения и концентрирования лентивирусного вектора для CAR-трансгена.

5. Подбор условий для осуществления эффективной трансдукции первичной культуры МПК *in vitro* с последующей селекцией CAR-клеток.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые для повышения эффективности обогащения культивируемых НК-клеток был использован FCS, который, по данным литературы, ранее не применяли при культивировании НК- и НКТ-клеток. Кроме того, был изучен эффект таких классических активаторов деления иммунных клеток, как L-ФГА и КонА, на первичную культуру лимфоцитов в режиме длительного культивирования в течение 21 дня. В данной работе впервые был разработан протокол для экспансии НК-клеток на основе их соинкубации с клетками культуры НЕК 293Т. Также в исследовании впервые освещены достоинства и недостатки различных подходов к созданию CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток в их сравнительной характеристике.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получение многочисленной популяции НК- и НКТ-клеток, обладающих высокой пролиферативной и цитотоксической активностью, является неотъемлемой частью разработки терапевтического подхода к лечению онкологических заболеваний с применением CAR-модифицированных лимфоцитов. Оптимизация метода культивирования НК- и НКТ-клеток – необходимый этап при разработке клеточного продукта на основе CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток.

Полученные данные могут использоваться при проведении последующих доклинических и клинических испытаний, а также могут быть применены для масштабирования производства CAR-препарата, учитывая, что на данный момент в России не зарегистрировано ни одного отечественного препарата на основе CAR-НК- и/или CAR-НКТ-клеток. Применение такого клеточного продукта относится к отрасли персонализированной медицине, что соответствует самым современным тенденциям в лечении пациентов и отражает приоритеты научно-технологического развития Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Методология данной работы была выстроена в соответствии с поставленной целью и по результатам обзора научной зарубежной и отечественной литературы. Методы исследования включали сбор биологического материала (цельной крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата) и сопутствующих медицинских данных от здоровых доноров-добровольцев. В работе использовались вирусологические и молекулярно-генетические (трансфекция, трансдукция), иммунологические (проточная цитометрия, цитотоксический тест) и молекулярно-клеточные (выделение клеток из биологического материала, оценка жизнеспособности, подсчет количества клеток, длительное культивирование) методы. Результаты, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке и визуализации.

Личный вклад автора

Исходя из темы диссертации, автор принимал личное участие при выборе направления исследования, и разработке его дизайна, а также при определении цели и задач исследования. Вся экспериментальная часть исследования (выделение МПК, культивирование лимфоцитов, трансдукция, трансфекция, цитометрия, цитотоксический тест), а также обработка, визуализация и интерпретация полученных данных выполнена лично диссертантом. Подготовка публикаций научного исследования по проведенной работе, апробация результатов исследования, написание и оформление данной рукописи выполнены автором самостоятельно.

Положения, выносимые на защиту

1. При изучении влияния различных комбинаций цитокинов (ИЛ-2+ИЛ-15, ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, или только ИЛ-2) на популяции НК- и НКТ-клеток при их длительном культивировании в течение 21-го дня после активации посредством МАТ было установлено, что максимальный прирост общей численности иммунных клеток, наиболее выраженная пролиферация НК- и НКТ-клеток и самая высокая цитотоксичность первичной культуры лимфоцитов человека, наблюдается при добавлении в питательную среду комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21.

2. Среди активаторов пролиферации нецитокинового происхождения (МАТ, L-ФГА, Кона или МАТ+FCS) наиболее предпочтительным способом для экспансии смешанной популяции НК- и НКТ-клеток является применение комбинации МАТ+FCS, поскольку при этом определяется наибольший прирост общего количества иммунных клеток и максимальное абсолютное число CD56+лимфоцитов.

3. При использовании фидерных клеток линии НЕК 293Т для стимуляции пролиферации НК- и НКТ-клеток наиболее выраженная пролиферация НК-клеток наблюдается в результате применения протокола, включающего однократную соинкубацию с клетками НЕК 293Т в начале культивирования.

4. Для повышения эффективности лентивирусной трансдукции лимфоцитов необходимо концентрирование вирусосодержащего материала в присутствии 25%-ного PEG8000 и разделение клеточных популяций перед активацией, а для обогащения популяции CAR-лимфоцитов – проведение селекции.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Положения диссертации соответствуют паспорту научных специальностей: 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований пункта 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» и пункта 7 «Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий» паспорта 3.2.7. Иммунология. А также соответствует областям исследований пункта 5 «Проблемы генной инженерии, использования вирусов как векторов для доставки ксеногенного и дополнительного генетического материала в восприимчивую клетку. Вирусы как инструмент генной терапии. Создание химерных вирусных частиц с заданными свойствами» паспорта 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов определяется тщательным подбором лабораторных методов исследования, воспроизводимостью результатов, а также применением статистических подходов обработки полученных данных. Сформулированные выводы и практические рекомендации отражают результаты проделанной работы и согласуются с поставленными целью и задачами исследования.

Материалы работы доложены на конференциях с международным участием: XVII Всероссийская научно-практическая конференция имени А.Ю. Барышникова с международным участием, 2023 г.; Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology", посвященная 300-летию РАН, 2023 г.; Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology", посвященная 300-летию РАН, 2024 г.; 1st International Online Conference on Functional Biomaterials, 2024 г.; Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology", посвященная 80-летию Великой Победы, 2025 г. Апробация материалов диссертационного исследования проведена на совместной научной конференции Отдела вирусологии и Отдела иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (протокол № 3 от 22 сентября 2025г.).

Публикации по теме диссертации

По результатам проведенного исследования автором опубликовано 14 работ, в том числе 2 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в международных, зарубежных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, а также 4 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в изданиях, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, и 5 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Материалы работы включены в патент №2813531 от 13.02.2024.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 180 страницах печатного текста по общеустановленному плану, включая список литературы и приложения. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа проиллюстрирована 16 рисунками, имеет 13 таблиц. Список литературы состоит из 229 источников, из которых 9 отечественных и 220 зарубежных.

Благодарности

Считаю своим долгом выразить глубокую и искреннюю благодарность коллективу лаборатории Клеточного иммунитета и биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» и лично заведующему данной лаборатории Киселевскому Михаилу Валентиновичу за ценные научные и научно-практические рекомендации, помощь и неизменную поддержку на всех этапах подготовки диссертационной

работы. Я также чрезвычайно признательна за доверие и возможность профессионального роста, которые позволили мне завершить данное исследование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объектом исследования являлся биологический материал: цельная кровь и лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат. В исследовании было задействовано 20 образцов лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата и 15 образцов цельной крови, полученных от условно-здоровых доноров-добровольцев мужского и женского пола старше 18 лет.

Настоящее диссертационное исследование было проведено на базе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова в период с 2022 г. по 2025 г. Учитывая тип и цель каждого эксперимента, в лабораторных условиях последовательно был проведен ряд манипуляций с МПК. Все полученные результаты проходили этап статистической обработки, сравнивались, анализировались и подлежали визуализации. Главными направлениями исследования были оптимизация эффективности трансдукции, изучение различных веществ в качестве активаторов пролиферации лимфоцитов и подбор их оптимальных концентраций, определение воздействия интерлейкинов и/или фидерных клеток на экспансию НК- и НКТ-клеток.

Для выделения лимфоцитов использовали метод седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла ($\rho=1,077$ г/см³) (ПанЭко, Россия). Для активации свежевыделенных МПК применяли биodeградируемые наночастицы (GenScript, США), МАТ к CD3, CD28-антителам (BioLegend, США), L-ФГА (Sigma, США), КонА (Sigma, США), а также FCS, который был получен ранее другой исследовательской группой [Ustyuzhanina et al., 2016]. FCS был любезно предоставлен профессором А.И. Усовым (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН). Кроме того, для активации МПК использовали клеточную линию НЕК 293Т. Подсчет общего количества клеток проводили в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея) после предварительного добавления витального красителя трипанового синего (ПанЭко, Россия). Первичную культуру МПК выращивали в питательной среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 4 мМ L-глутамина, 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 250 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 (Peprotech, США), 10 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-15 (Sci-Store, Россия) и/или 20 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-21 (Peprotech, США). Для оценки соотношения субпопуляций лимфоцитов и их рецепторного профиля использовали метод проточной цитофлуориметрии (Проточный цитофлуориметр Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США)). Цитотоксическую активность МПК определяли путем постановки цитотоксического теста с опухолевыми клеточными линиями (HG3, K562 и T47D-HER2+) в качестве клеток-мишеней и добавлением раствора резазурина (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу AlamarBlue Cell Viability Reagent Product Information Sheet (Pub. No. MAN0018317 C.0). Для определения флуоресценции клеток использовали мультирежимный планшетный ридер Spark (Tecan, Швейцария). Сборку лентивирусного вектора проводили путем трансфекции НЕК 293Т плазмидами pLenti-PGK-GFP (L-GFP) (Addgene, США), pCMV-VSV-G (Addgene, США) и pCMV-ΔR8.2 (Addgene, США), а также плазмиду pLenti-PGK-CD16-CAR (L-CAR), в которой генетическая последовательность CD16-CAR была клонирована вместо последовательности зеленого флуоресцентного белка (GFP) в pLenti-PGK-GFP. CAR-лимфоциты получали с помощью трансдукции лимфоцитов с применением лентивирусного вектора в присутствии

полибрена (Sigma-Aldrich, США), в качестве положительного контроля использовали клеточную линию Jurkat. Все эксперименты проводились в стерильных условиях в ламинарном шкафу NEOTERIC (Ламинарные системы, Россия). Культуры клеток инкубировали в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) при +37°C.

В каждой серии экспериментов использовали не менее 3-х образцов цельной крови или лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата. Каждый эксперимент повторялся не менее 3-х раз. Обработку и анализ данных проводили с использованием программных обеспечений Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США) и GraphPad ver.10 (GraphPad Software Inc., США). Данные экспериментов представлены в работе как среднее значение \pm SD. Результаты проанализированы с использованием Statistica 10. Тест ANOVA с критерием Tukey HSD использовался для оценки различий. Достоверными считали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, чаще всего для *in vitro* экспансии НК-клеток используют интерлейкины, фидерные клетки и МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, длительность культивирования НК- и НКТ-клеток в большинстве протоколов составляет 21 день. В данной работе проводили экспансию НК- и НКТ-клеток путем длительного культивирования (14 или 21 день) в первичной культуре МПК без разделения клеточных популяций, а также генетическую модификацию МПК с целью получения CAR-лимфоцитов. Сразу после выделения МПК проводили стимуляцию пролиферации с помощью веществ-активаторов, затем выращивали клетки при добавлении цитокинов. Также в исследовании использовали аллогенные фидерные клетки, соинкубацию с которыми проводили после выделения МПК или на более поздних сроках культивирования. Генетическую модификацию МПК с целью получения CAR-лимфоцитов проводили сразу после этапа активации.

Исходя из поставленных задач, данное исследование объединяет 4 направления:

- Определение эффективного активатора пролиферации нецитокинового происхождения для экспансии НК- и НКТ-клеток;
- Подбор комбинации цитокинов, приводящей к пролиферации НК- и НКТ-клеток;
- Оптимизация методики соинкубации МПК с фидерными клетками линии НЕК 293Т;
- Сравнение методик для создания CAR-лимфоцитов с целью получения высокой экспрессии CAR-трангена.

Воздействие различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность НК- и НКТ-клеток

С целью подбора оптимальной комбинации цитокинов, обеспечивающей активацию, пролиферацию и поддержание эффекторных функций культивируемых лимфоцитов, определяли общее число МПК, экспрессию активационных маркеров, а также проводили оценку популяционного состава первичной культуры МПК и ее цитотоксической активности. В литературе, описывающей методы культивирования НК-клеток, чаще всего используются ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21. Мы решили исследовать данные цитокины в комбинациях ИЛ-2+ИЛ-15 и ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 (Рисунок 1). В качестве группы контроля мы использовали клетки, культивируемые в присутствии только ИЛ-2. В данной серии экспериментов первичную культуру лимфоцитов активировали с помощью сорбированных в культуральном планшете МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, поскольку данный вариант активации используется в большинстве протоколов

для экспансии НК- или Т-клеток.

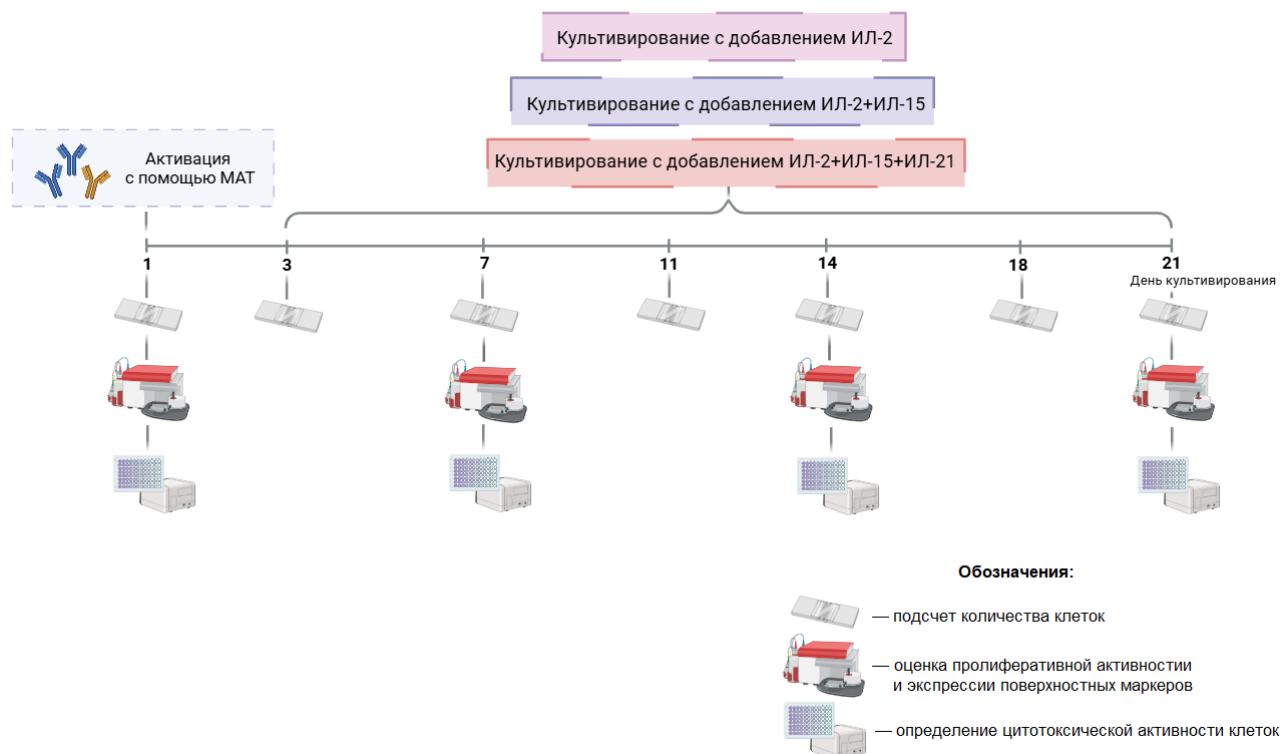


Рисунок 1 – Дизайн исследования, направленного на изучение воздействия комбинаций цитокинов на НК- и НКТ-клеток

Количество клеток, взятых для активации и культивирования, было одинаковым вне зависимости от исследуемой комбинации цитокинов и составляло $3 \cdot 10^6$. Наибольший прирост численности МПК ($560 \cdot 10^6 \pm 30 \cdot 10^6$ клеток) к концу срока культивирования наблюдали при культивировании клеток в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 ($p < 0,05$ по сравнению с культивированием с ИЛ-2+ИЛ-15 или только с ИЛ-2). Численность МПК при культивировании с ИЛ-2+ИЛ-15 составляла $420 \cdot 10^6 \pm 22 \cdot 10^6$ клеток, а при культивировании только с ИЛ-2 – $390 \cdot 10^6 \pm 20 \cdot 10^6$ клеток.

На следующем этапе мы изучали экспрессию активационных маркеров на поверхности клеток, а также соотношение популяций лимфоцитов. В качестве маркеров активации использовали NKG2D и НКp30. Также мы определяли долю клеток, экспрессирующих CD16. При изучении активаторов пролиферации экспрессия эндогенного CD16 являлась одним из критериев сравнения методов культивирования клеток, поскольку в данной работе в качестве CAR-рецептора использовали «универсальный» CAR, сконструированный на основе CD16-рецептора.

Наибольшее увеличение доли CD56+клеток ($59,7 \pm 5,3\%$ к концу срока культивирования, $p < 0,05$ по сравнению с началом культивирования) наблюдали при наличии в питательной среде всех трех цитокинов, в то время как при культивировании в присутствии только ИЛ-2 доля CD56+лимфоцитов была $42 \pm 4\%$, а при добавлении ИЛ-2+ИЛ-15 – $45 \pm 4\%$. Доля CD3-CD56+НК-клеток в зависимости от добавления интерлейкинов менялась незначительно, тем не менее, при добавлении ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 наблюдали тенденцию к увеличению, по сравнению с другими режимами культивирования, доли НК-клеток до $1,1 \pm 0,2\%$. При культивировании с ИЛ-2 доля CD3-CD56+НК-клеток к 21-му дню культивирования составила $0,2 \pm 0,1\%$, при культивировании с ИЛ-2+ИЛ-15 – $0,1 \pm 0,1\%$.

Наибольшая, по сравнению с другими режимами культивирования, экспрессия активационного маркера NKG2D, главным образом, за счет прироста популяции CD56+NKG2D+клеток, была выявлена среди МПК, культивируемых

с ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. Доля CD56+NKG2D+клеток к 21-му дню культивирования составляла $50\pm4\%$ ($p<0,05$ по сравнению с использованием ИЛ-2+ИЛ-15 или только ИЛ-2). К концу срока культивирования 86% всех CD56+клеток экспрессировали активационный маркер NKG2D, что свидетельствует об их активации и пролиферации. При добавлении комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 наблюдали самый низкий уровень экспрессии NKp30-рецептора в сравнении с другими режимами культивирования в течение всего срока исследования (доля NKp30+лимфоцитов к 21-му дню культивирования составляла $2,3\pm0,3\%$, $p<0,05$ по сравнению с использованием ИЛ-2+ИЛ-15 или только ИЛ-2). Статистически значимого различия в экспрессии CD16-рецептора в зависимости от присутствующих в питательной среде цитокинов выявлено не было.

Зная общее количество МПК, а также доли CD3-CD56+НК-клеток, CD3+CD56+НКТ-клеток и CD3+CD56-Т-лимфоцитов, мы определяли абсолютное число клеток данных популяций. По сравнению с другими режимами активации статистически значимое ($p<0,05$) возрастание количества CD3-CD56+НК-клеток и CD3+CD56+НКТ-клеток к концу срока культивирования было установлено при культивировании МПК в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 (Таблица 1).

Таблица 1 – Абсолютное число МПК на 21-й день культивирования в зависимости от добавляемых в питательную среду интерлейкинов

Показатель	МПК до активации	Культивирование с ИЛ-2	Культивирование с ИЛ-2, ИЛ-15	Культивирование с ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21
Общее количество клеток, $\cdot 10^6$	$3,0\pm0,0$	$391,1\pm40,1$	$420,3\pm35,4$	$556,3\pm50,9$
Количество CD3-CD56+ клеток, $\cdot 10^6$	$0,3\pm0,1$	$1,0\pm0,1$	$0,4\pm0,1$	$6,0\pm0,7$
Количество CD3+CD56+ клеток, $\cdot 10^6$	$0,13\pm0,1$	$165,2\pm15,4$	$187,2\pm19,1$	$326,5\pm36,3$
Количество CD3+CD56-клеток, $\cdot 10^6$	$1,8\pm0,2$	$222,9\pm29,7$	$231,4\pm40,1$	$221,0\pm29,7$

Цитотоксическую активность культивируемых МПК изучали, используя в качестве мишени суспензионную культуру клеток В-клеточной лимфомы HG3, при проведении цитотоксического теста соотношение эффектор: мишень равнялось 5:1. При длительном культивировании наблюдали постепенное увеличение цитотоксической активности клеток при всех режимах культивирования. Наибольшая цитотоксичность к 21-му дню культивирования была установлена для МПК, которые выращивали при добавлении только ИЛ-2 (процент погибших клеток HG3 – $72,4\pm5,8\%$) или комбинации ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 ($78,9\pm4,6\%$).

Согласно результатам, полученным в данной работе, наибольшая экспансия CD3-CD56+НК-клеток и CD3+CD56+НКТ-клеток наблюдается при культивировании с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. При данном режиме культивирования определяли самую высокую сравнительную экспрессию активационного маркера NKG2D на поверхности CD56+клеток, а также высокую цитотоксическую активность первичной культуры МПК.

Особенности экспансии и фенотипических характеристик первичной культуры МПК человека под действием различных активаторов пролиферации

В данной серии экспериментов проводили оценку влияния различных веществ-активаторов нецитокинового происхождения на пролиферацию, фенотипические характеристики и цитотоксичность первичной культуры МПК человека без разделения клеточных популяций. В качестве активаторов мы использовали МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, L-ФГА, КонА, а также комбинацию МАТ к CD3- и CD28-рецепторам + FCS (Рисунок 2). Выделенные из периферической крови или лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата МПК добавляли к сорбированным МАТ

или помещали в питательную среду, содержащую L-ФГА или КонА. При активации комбинацией МАТ + FCS, FCS добавляли к питательной среде, содержащей свежевыделенные МПК, а затем вносили суспензию клеток в лунки с сорбированными МАТ.

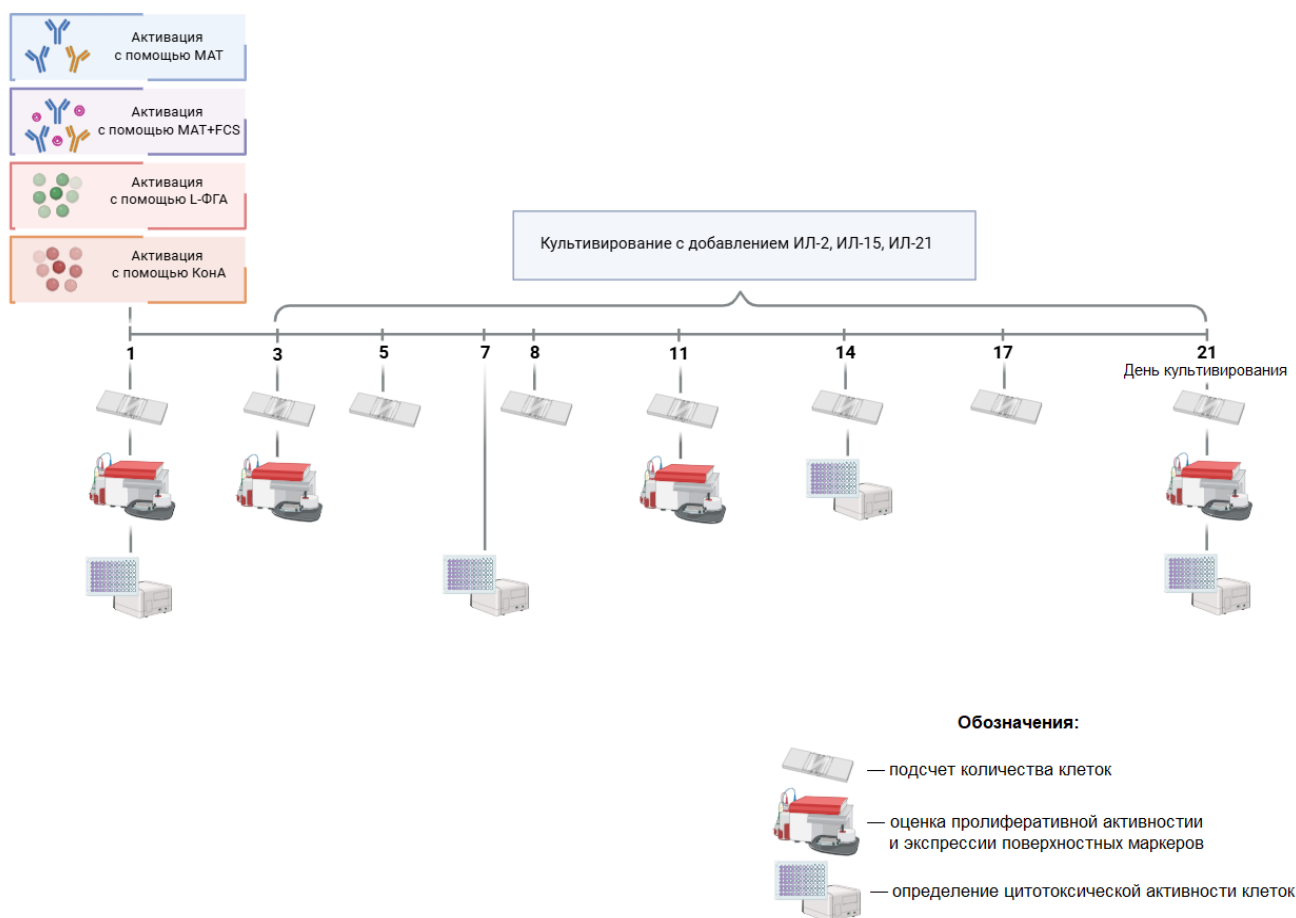


Рисунок 2 – Дизайн исследования активаторов пролиферации нецитокинового происхождения

На первом этапе были подобраны оптимальные концентрации активаторов, вызывающие наиболее активную пролиферацию клеток без истощения лимфоцитов. Максимальную пролиферацию клеток наблюдали при следующих концентрациях: 2,5 мкг/мл анти-CD3-МАТ, 5 мкг/мл анти-CD28-МАТ; 5 мкг/мл и 10 мкг/мл L-ФГА; 5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл КонА. В последующих экспериментах использовали только данные концентрации активаторов.

Далее проводили сравнительный анализ активации и деления МПК под действием различных активаторов, оценивая интенсивность пролиферации и экспрессию поверхностных маркеров на 3-й день активации. В качестве маркеров активации использовали NKG2D, NKp30, CD38, CD69 и CD25. Было установлено, что пролиферативная активность МПК достоверно возрастала (процент поделившихся клеток составлял от $39,7 \pm 1,9\%$ до $43,4 \pm 3,4\%$), однако статистически значимого различия в группах клеток, подверженных различными способами активации, выявлено не было. На 3-й день после начала стимуляции пролиферации статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличивалась экспрессия таких активационных маркеров, как NKG2D, CD38, CD69 и CD25 (Таблица 2), и снижалась доля NKp30+клеток относительно неактивированных клеток. При добавлении FCS статистически достоверно ($p < 0,05$) возрастала доля CD3+CD25+ и CD56+CD25+ клеток (относительно активации только с помощью МАТ).

Таблица 2 – Экспрессия активационных маркеров на 3-й день после активации

Показатель	Способ активации				
	МПК до активации	МАТ	МАТ + FCS	L-ФГА	КонА
Доля NKG2D+клеток, %	15,2±3,0	26,3±1,6	25,8±3,4	28,7±3,0	29,4±2,1
Доля NKp30+клеток, %	37,0±5,1	20,7±1,9	18,4±2,3	14,0±4,0	10,6±3,4
Доля CD38+клеток, %	1,0±0,7	82,1±4,0	83,8±7,2	91,8±6,5	99,6±1,0
Доля CD69+клеток, %	0,2±0,1	80,5±4,0	85,3±4,7	94,0±3,7	94,0±5,0
Доля CD3+CD25+клеток, %	1,3±0,4	35,1±3,4	57,3±5,8	73,8±4,5	72,8±6,0
Доля CD56+CD25+клеток, %	0,6±0,2	1,9±0,1	5,9±1,4	6,9±1,1	5,1±1,8

Далее мы оценивали влияние активаторов на первичную культуру МПК при длительном культивировании в течение 21 дня. Активацию МПК проводили после выделения, количество клеток, взятых для активации, было одинаковым для любого способа активации и составляло $3 \cdot 10^6$. После активации МПК культивировали при добавлении ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21. Наибольший прирост общего числа лимфоцитов за 21 день культивирования наблюдался при активации МАТ+FCS ($p < 0,05$ при сравнении с другими режимами активации) (Таблица 3). Исходя из определения общего количества культивируемых клеток и доли субпопуляций было статистически достоверно ($p < 0,05$) установлено, что абсолютное число CD3-CD56+НК-клеток было наибольшим при активации L-ФГА, а самая высокая пролиферация CD3+CD56+НКТ-клеток наблюдалась при активации с помощью МАТ+FCS (Таблица 3).

Таблица 3 – Абсолютное число клеток различных популяций на 21-й день культивирования

	МПК до активации	Активация МАТ	Активация МАТ+FCS	Активация L-ФГА	Активация КонА
Общее количество клеток, $\cdot 10^6$	3,0±0,0	145,2±12,1	167,3±9,2	114,2±12,3	84,1±9,1
Количество CD3+CD56-клеток, $\cdot 10^6$	2,1±0,2	66,7±6,5	68,3±7,1	98,2 ± 1,1	66,9 ± 6,9
Количество CD3-CD56+клеток, $\cdot 10^6$	0,4±0,1	2,9±0,3	3,0±0,4	7,1±0,8	4,8±0,5
Количество CD3+CD56+клеток, $\cdot 10^6$	0,2±0,0	75,8±7,8	94,1±9,6	6,2±0,8	11,6±1,4

При изучении цитотоксической активности культивируемых клеток в отношении культуры клеток T47D-HER2+ (соотношение эффектор: мишень 5:1) было определено постепенное увеличение цитотоксичности к клеткам-мишеням к 21-му дню культивирования вне зависимости от способа активации (процент погибших клеток T47D-HER2+ на 21-й день культивирования составил от 80,4±6,7% до 87,4±6,2%). Статистически достоверного отличия в цитотоксической активности иммунных клеток, активированных разными вариантами, выявлено не было.

При исследовании иммунофенотипа культивируемых МПК определяли долю CD3-CD56+НК-клеток, CD3+CD56+НКТ-клеток и CD3+CD56-T-лимфоцитов и экспрессию NKG2D- и CD16-маркеров. К концу срока культивирования наибольшая доля CD3-CD56+НК-клеток была определена в группах, активированных L-ФГА или КонА ($p < 0,05$ при сравнении с клетками, активированными МАТ или МАТ+FCS). Максимальная доля CD3+CD56+НКТ-клеток регистрировалась после активации МАТ или МАТ+FCS ($p < 0,05$ при сравнении с клетками, активированными L-ФГА или КонА) (Рисунок 3).

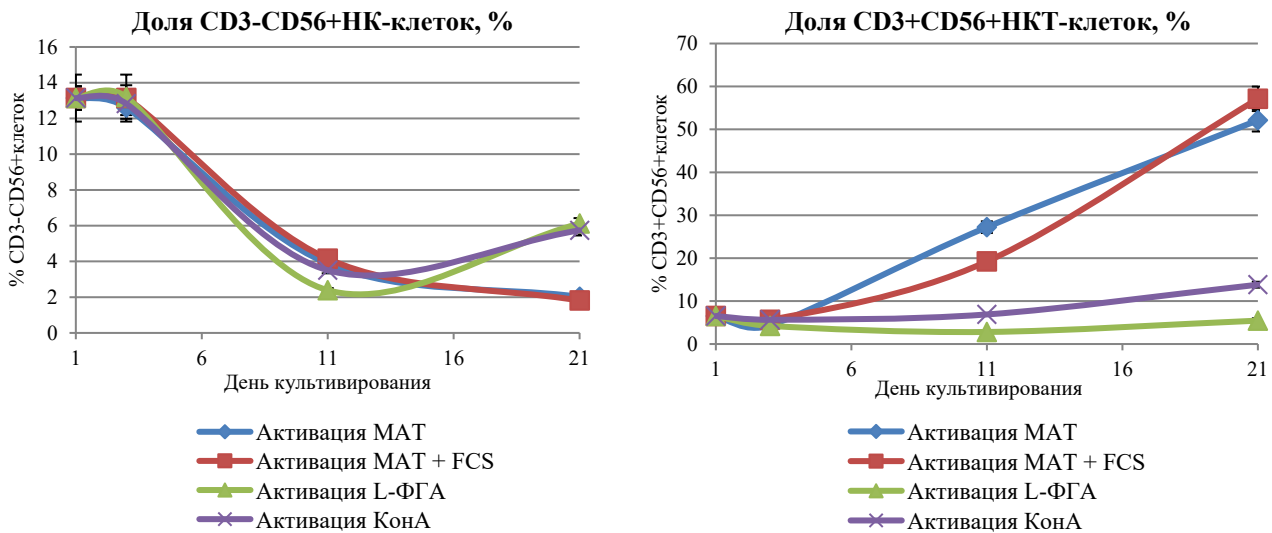


Рисунок 3 – Экспрессия маркеров НК-, НКТ-клеток в динамике культивирования в зависимости от способа активации

Самую высокую экспрессию NKG2D-рецептора на 21-й день наблюдали после активации МАТ ($82,7 \pm 8,3\%$ NKG2D+клеток) или МАТ+FCS ($84,3 \pm 7,9\%$) ($p < 0,05$ при сравнении с экспрессией NKG2D на клетках, активированных L-ФГА или КонА). К концу срока культивирования после активации МАТ или МАТ+FCS CD16-маркер определяли на поверхности CD3+лимфоцитов (доля CD3+CD16+клеток после активации МАТ составляла $5,6 \pm 0,5\%$, после активации МАТ+FCS – $5,5 \pm 0,7\%$), в то время как при активации ФГА более высокая экспрессия CD16-маркера была выявлена на поверхности CD56+клеток (доля CD56+CD16+клеток равнялась $6,0 \pm 0,6$).

Таким образом, самым предпочтительным из представленных в данной работе способов активации клеток первичной культуры МПК является использование МАТ+FCS, так как при данном режиме активации наблюдали наибольший прирост клеток, обладающих высокой цитотоксической активностью. Наиболее подходящим способом для экспансии смешанной популяции НК- и НКТ-клеток также является применение комбинации МАТ+FCS, поскольку при этом наблюдается максимальное абсолютное число CD56+клеток с высокой экспрессией активационного маркера NKG2D на их поверхности.

Оптимизация методики использования клеточной линии НЕК 293Т в качестве фидерных клеток для экспансии НК- и НКТ-клеток

Следующим направлением исследования являлось изучение влияния аллогенных фидерных клеток на пролиферацию НК- и НКТ-клеток в первичной культуре МПК после их соинкубации. В качестве фидерных клеток была выбрана эмбриональная культура клеток почек человека НЕК 293Т. В качестве контроля мы использовали первичную культуру МПК, активированную с помощью МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. В целях оптимизации протокола использования фидерных клеток мы применяли два различных подхода: методы активации, включающие активацию при помощи МАТ и НЕК 293Т (Рисунок 4) и метод активации при помощи только фидерных клеток НЕК 293Т. При всех вариантах активации в ростовую среду для МПК добавляли ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21. Эффективность применяемого метода активации МПК оценивали по доле клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры активации, соотношению популяций лимфоцитов, а также по показателям цитотоксического теста, который проводили на трех культурах-мишенях: T47D-HER2+, HG3 и K562. При постановке цитотоксических тестов на культурах-мишенях T47D-HER2+ и HG3 использовали анти-HER2 МАТ (трастузумаб) или анти-CD20 МАТ (ритуксимаб) соответственно, что позволило оценить как прямую цитотоксическую активность, так и антитело-зависимую клеточную цитотоксичность. При проведении цитотоксических тестов путем соинкубации МПК с K562 определяли только прямую

цитотоксическую активность культивируемых лимфоцитов.

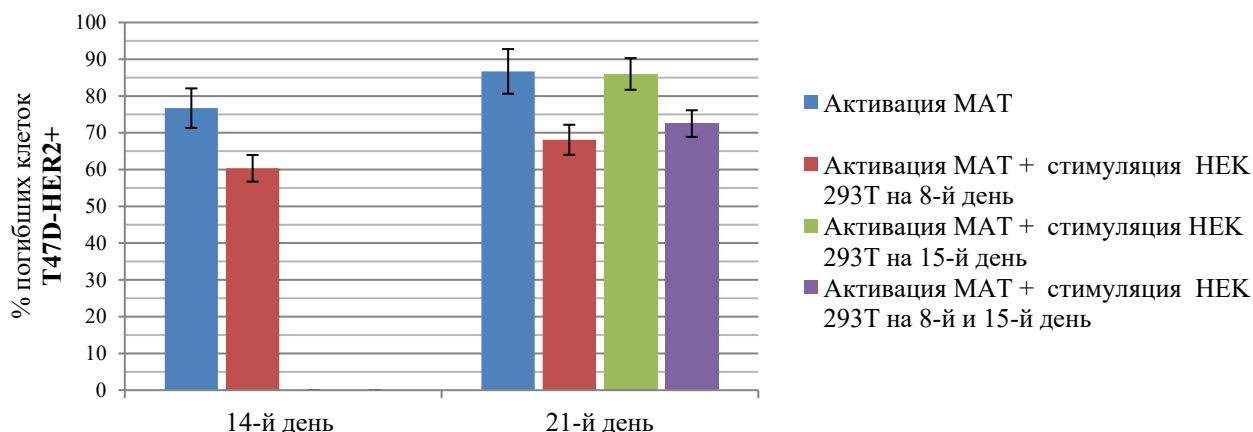


Примечания: А – активация только с помощью МАТ (контроль); Б – активация с помощью МАТ с последующей активацией HEK 293T на 8-й день культивирования; В – активация с помощью МАТ с последующей активацией HEK 293T на 15-й день культивирования; Г – активация с помощью МАТ с последующей активацией HEK 293T на 8-й и 15-й день культивирования

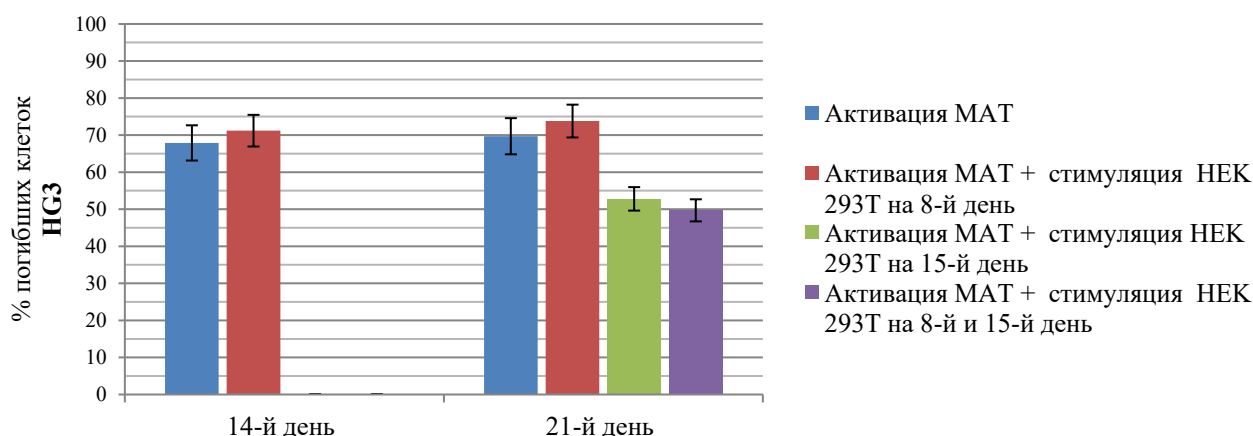
Рисунок 4 – Схема активации первичной культуры лимфоцитов с использованием МАТ и фидерных клеток HEK 293T

Активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой HEK 293T на 8-й день культивирования. После однократной стимуляции культурой HEK 293T на 14-й день культивирования было определено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение доли CD3-CD56+клеток до $15,2 \pm 1,7\%$, CD56+CD16+клеток до $20,3 \pm 3,0\%$, CD56+CD4+клеток до $7,5 \pm 0,9\%$, CD56+NKp30+клеток до $25,7 \pm 2,6\%$ по сравнению с клетками, активированными при помощи МАТ. Аналогичные показатели контрольной группы на 14-й день составили: доля CD3-CD56+НК-клеток – $6,9 \pm 0,8\%$, CD56+CD16+клеток – $7,8 \pm 1,4\%$, CD56+CD4+НК-клеток – $1,7 \pm 1,8\%$, CD56+NKp30+клеток – $17,7 \pm 1,9\%$. При исследовании на 21-й день культивирования было выявлено снижение уровня экспрессии всех вышеупомянутых маркеров до уровней контрольной группы, доля CD16+клеток также уменьшалась, однако оставалась выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). МПК, дополнительно стимулированные фидерными клетками, проявляли такую же цитотоксическую активность в отношении культур-мишеней HG3 и K562, как и клетки из контрольной группы (Рисунок 5).

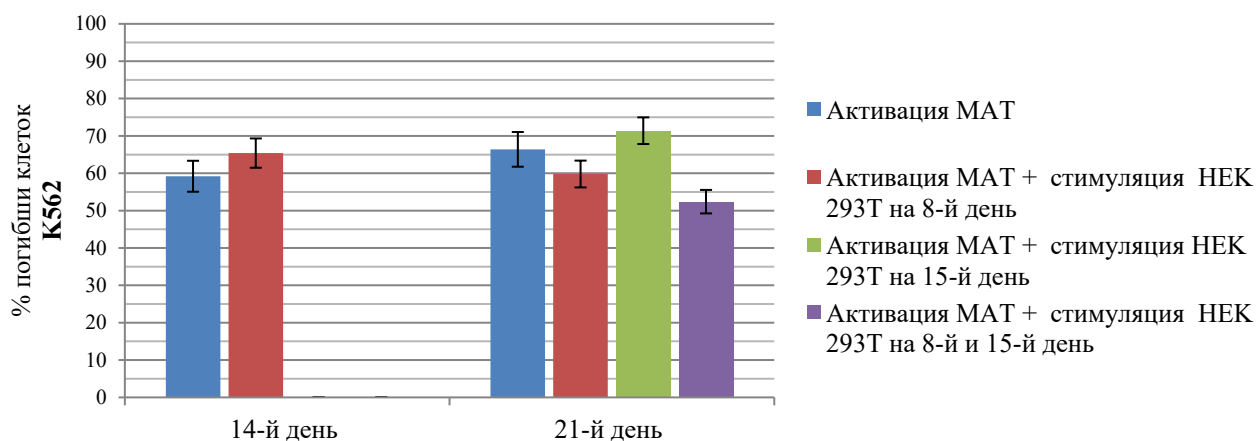
А



Б



В



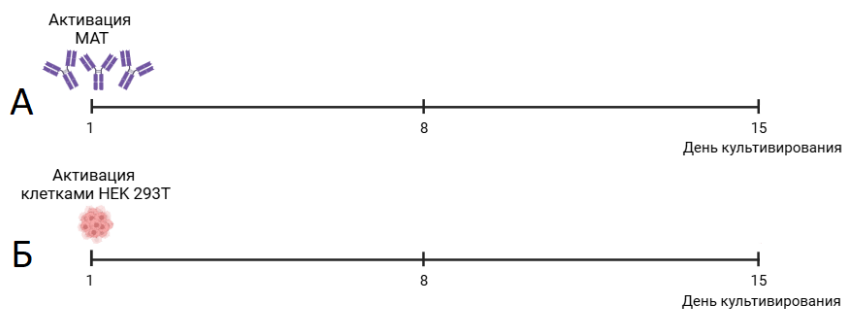
Примечания: А – культура-мишень T47D-HER2+; Б – культура-мишень HG3; В – культура-мишень K562
 Рисунок 5 – Процент погибших клеток-мишеней в цитотоксическом тесте, проводимом на МПК, стимулированных МАТ и культурой НЕК 293Т

Активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 15-й день культивирования. Однократная соинкубация с фидерными клетками на 15-й день культивирования приводила к статистически достоверному ($p < 0,05$) увеличению доли CD56+CD4+НКТ-клеток ($6,4 \pm 0,7\%$ от общей популяции МПК), CD56+CD16+клеток ($17,2 \pm 1,9\%$), CD56+NKp30+клеток ($25,0 \pm 2,7\%$) и иммунорегуляторного индекса ($1,8 \pm 0,3$) на 21-й день культивирования по сравнению с клетками контрольной группы. При активации с помощью МАТ доля CD56+CD4+НКТ-клеток равнялась $1,0 \pm 0,6\%$, доля CD56+CD16+клеток – $5,8 \pm 1,1\%$, доля CD56+NKp30+клеток – $6,8 \pm 0,8\%$, иммунорегуляторный индекс составлял $0,4 \pm 0,3$. При данном

подходе к активации не наблюдали существенного увеличения доли CD3-CD56+НК-клеток по сравнению с культурой, активированной только МАТ. Вероятно, это связано с ограниченным потенциалом деления двухнедельной зрелой культуры лимфоцитов. При данном режиме активации наблюдали снижение цитотоксической активности МПК при проведении цитотоксического теста на клетках-мишенях HG3, а различия в цитотоксической активности в отношении культур T47D-HER2+ и K562 оказались статистически недостоверными по сравнению с контролем (Рисунок 5).

Активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования. В результате активации МАТ и двукратной стимуляции фидерными клетками было выявлено достоверное снижение цитотоксической активности в сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$ (Рисунок 5). Однако, к концу срока культивирования при данном режиме активации наблюдали максимальную ($p < 0,05$ в сравнении с контролем или подходами с использованием однократной соинкубации с НЕК 293Т) долю CD56+CD4+, CD56+NKp30+ и CD56+CD16+клеток. Доля CD56+CD4+клеток составила $49,6 \pm 5,8\%$, доля CD56+NKp30+клеток – $57,1 \pm 5,9\%$, а доля CD56+CD16+клеток – $54,7 \pm 5,7\%$. При активации с помощью МАТ доля CD56+CD4+клеток равнялась $1,0 \pm 0,6\%$, доля CD56+NKp30+клеток – $6,8 \pm 0,8\%$, доля CD56+CD16+клеток – $5,8 \pm 1,1\%$.

Активация только клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования. Принципиально иным подходом к активации и обогащению популяции НК-клеток являлась стимуляция неактивированных МПК клетками НЕК 293Т без использования МАТ (Рисунок 6). В качестве контроля использовали МПК, активированные МАТ, культивирование проводили в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21 в течение 14 дней. При всех вариантах активации в ростовую среду для МПК добавляли ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21.



Примечания: А – активация только с помощью МАТ в начале культивирования (контроль);

Б – активация только клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования

Рисунок 6 – Схема активации первичной культуры лимфоцитов с использованием МАТ к CD3-, CD28-рецепторам или фидерных клеток НЕК 293Т

Поскольку в условиях стимуляции пролиферации без использования МАТ отсутствовала активация Т-клеточного рецептора, это приводило к ограниченной экспансии Т- и НКТ-клеток, что отражалось на невысоком, относительно контроля, приросте общего числа клеток первичной культуры лимфоцитов (Таблица 4).

Таблица 4 – Абсолютное число МПК на 14-й день культивирования в зависимости от способа активации, $p < 0,05$

Показатель	МПК до активации	Активация МАТ	Активация НЕК 293Т
Общее количество клеток, $\cdot 10^6$	1	59 ± 6	$3,5 \pm 1$

Тем не менее, данный режим активации лимфоцитов оказался самым эффективным для экспансии популяции НК-клеток: уже на 4-й день культивирования доля CD3-CD56+НК-клеток составляла $43,3 \pm 4,4\%$, а доля CD3+CD56+НКТ-клеток – $17,1 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$ при сравнении с показателями контрольной группы) (Таблица 5).

Таблица 5 – Экспрессия поверхностных маркеров культивируемых лимфоцитов после стимуляции клеточной линией НЕК 293Т, проводимой однократно в начале культивирования

Показатель	День культивирования							
	МПК до активации	Активация МАТ				Активация НЕК 293Т		
	1-й	4-й	11-й	14-й	4-й	11-й	14-й	
Доля CD3-CD56+ клеток, %	19,3 ± 2,1	14,7 ± 1,7	7,7 ± 0,9	6,0 ± 0,8	43,3 ± 4,4	27,3 ± 2,8	29,2 ± 3,1	
Доля CD3+CD56+ клеток, %	3,5 ± 0,5	8,3 ± 0,9	41,7 ± 4,4	69,0 ± 7,2	17,1 ± 1,9	25,0 ± 2,8	45,8 ± 4,8	
Доля CD3+CD56- клеток, %	52,2 ± 5,6	63,8 ± 6,5	57,5 ± 6	36,1 ± 3,8	25,9 ± 2,5	45,9 ± 4,7	18,3 ± 2,1	

Далее мы проанализировали распределение маркеров ранней активации в первичной культуре МПК. Было выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии данных рецепторов на поверхности CD56+клеток в сравнении с контролем, что указывает на активацию CD56+популяции НК- и НКТ-клеток после контакта с НЕК 293Т (Таблица 6).

Таблица 6 – Экспрессия ранних маркеров активации на 4-й день после стимуляции МПК клеточной линией НЕК 293Т, проводимой в начале культивирования

Показатель	Активация МАТ	Активация НЕК 293Т
Доля CD38+ клеток, %	83,2 ± 8,4	58,3 ± 6,1
Доля CD56+CD38+ клеток, %	17,1 ± 1,9	36,7 ± 3,8
Доля CD69+ клеток, %	86,4 ± 8,6	27,1 ± 2,8
Доля CD56+CD69+ клеток, %	17,3 ± 1,8	22,1 ± 2,2
Доля CD25+ клеток, %	64,6 ± 6,6	24,9 ± 2,6
Доля CD56+CD25+ клеток, %	6,1 ± 0,8	23,7 ± 2,6

При сравнении с культурой, активированной при помощи МАТ, после активации фидерными клетками среди CD56+клеток с 4-го до 14-й день культивирования возрастала доля NKG2D+, NKp30+ и CD16+клеток ($p < 0,05$). На 14-й день доля CD56+NKG2D+клеток составила $74,7 \pm 7,6\%$, доля CD56+NKp30+клеток – $54,1 \pm 5,6\%$, доля CD56+CD16+клеток – $51,5 \pm 5,7\%$ (после активации МАТ данные показатели были $62,7 \pm 6,5\%$, $8,0 \pm 0,9\%$ и $4,9 \pm 0,5\%$ соответственно). Культура МПК, активированная только с помощью клеток НЕК 293Т, проявляла цитотоксическую активность, схожую с МПК, активированными МАТ.

Таким образом, однократная активация клеточной линией НЕК 293Т без использования МАТ является наиболее предпочтительным протоколом для экспансии НК- и НКТ-клеток среди рассматриваемых в данной работе, позволяющим увеличить долю CD56+лимфоцитов до $60,4 \pm 4,8\%$ в первичной культуре лимфоцитов уже на 4-й день после активации. Перспективность дальнейшего использования клеточной линии НЕК 293Т для стимуляции МПК заключается в простоте проведения генетических манипуляций с данной культурой. Например, экспрессия опухоль-ассоциированных антигенов, связанных с мембраной цитокинов и/или иных активирующих молекул сможет улучшить распознавание антигенов, выживаемость, пролиферацию и цитотоксическую активность НК- и НКТ-клеток.

Подбор условий для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов

В данном исследовании проводили оптимизацию получения лентивируса, несущего гены CAR, а также подбирали условия для эффективного встраивания CAR-трансгена в лимфоциты. Мы получали смешанную популяцию CAR-лимфоцитов, не уделяя особого внимания трансдукции НК- или НКТ-клеток в отдельности. В качестве внеклеточного антигенраспознающего фрагмента CAR выступал активирующий Fc-рецептор CD16. Наряду с

этим использовали лентивирус, в векторе которого вместо генов CAR была закодирована последовательность флуоресцентного белка GFP.

При сборке вирусных частиц использовали плазмиды:

- L-GFP. В данной плазмиде закодирована генетическая информация о репортерном флуоресцентном белке GFP. Также плазида содержит ген устойчивости к антибиотику бластицидину;
- L-CAR, в которой генетическая последовательность CD16-CAR была клонирована вместо GFP в плазмиде L-GFP, плазида также содержит ген устойчивости к антибиотику бластицидину;
- pCMV-VSV-G. Это вспомогательная плазида для сборки лентивирусной частицы, она кодирует последовательность белка оболочки вируса.
- pCMV-ΔR8.2 также является вспомогательной плазмидой, используемой для упаковки лентивирусов.

Сборку лентивирусных частиц проводили путем трансфекции клеток НЕК 293Т с использованием плазмид L-GFP + pCMV-VSV-G + pCMV-ΔR8.2 или L-CAR + pCMV-VSV-G + pCMV-ΔR8.2. Генетическую модификацию лимфоцитов проводили посредством трансдукции с использованием полученного лентивируса.

В работе проводили сравнение двух протоколов трансфекции, в которых в качестве доставщика генетического материала использовали липофектамин или кальций-фосфат. Оценка эффективности метода проводили по уровню экспрессии флуоресцентного белка GFP в клетках НЕК 293Т. Было показано, что при использовании липофектамина доля GFP+ клеток НЕК 293Т после трансфекции составляла $82 \pm 7\%$, а при применении кальций-фосфата – $64 \pm 8\%$. Поэтому в дальнейших экспериментах вирусосодержащий материал получали путем трансфекции с применением липофектамина.

Далее мы решили оценить эффективность концентрирования вирусосодержащего материала с помощью двух различных способов: путем добавления 25%-ного PEG8000 или путем использования полибрена. Мы получили 10-кратные вирусные концентраты, которые затем использовали для трансдукции клеток линии НЕК 293Т. В качестве контроля брали неконцентрированный вирус, полученный путем трансфекции одномоментно с вирусным концентратом. После трансдукции доля GFP+клеток была существенно выше при использовании вирусных концентратов (Таблица 7).

Таблица 7 – Оценка эффективности концентрирования вирусосодержащего материала

	Неконцентрированный вирус	Концентрат, использование PEG8000	Концентрат, использование полибрена
Доля GFP+клеток НЕК 293Т	54 ± 6	79 ± 6	74 ± 9
Потеря функциональных частиц после концентрирования, %		< 50	< 20

Также мы анализировали потерю вирусных частиц при концентрировании лентивируса, содержащего ген GFP-белка, определяемую путем сравнения титра вируса до и после процесса концентрирования (Таблица 7). Оценка методики концентрирования вирусосодержащего материала проводили также при трансдукции клеток из фракции активированных CD4+, CD8+ лимфоцитов, полученных из первичной культуры МПК. Полибрен оказался статистически достоверно более токсичным для лимфоцитов: на 4-й день после трансдукции с полибреном количество клеток при использовании полибрена возросло в 9 ± 1 раз, а их жизнеспособность была $53 \pm 8\%$; при использовании PEG8000 количество клеток на 4-й день после трансдукции увеличивалось в 13 ± 2 раз при жизнеспособности $72 \pm 7\%$. Исходя из полученных данных о токсичности полибрена, в дальнейших экспериментах для концентрирования лентивирусов использовали PEG8000.

Концентрирование вирусосодержащего материала является неотъемлемой частью многих протоколов для получения лентивирусного вектора, оно позволяет увеличивать титр вируса и

множественность инфекции. Из рассматриваемых в данной работе способов концентрирования вирусосодержащего материала наиболее оптимальным протоколом является концентрирование с применением 25%-ного PEG8000, поскольку концентрирование с полибренном с последующей трансдукцией снижает жизнеспособность клеток первичной культуры МПК.

После подбора оптимальных условий для сборки и концентрирования лентивирусов проводили оценку эффективности лентивирусной трансдукции на культуре клеток МПК. С целью повышения частоты встраивания CAR-генов в геном МПК было предложено несколько подходов. В первую очередь мы исследовали действие различных активаторов пролиферации клеток на эффективность последующей трансдукции, так как для успешного проникновения лентивирусного вектора клетка должна быть активирована. Мы проводили активацию клеток первичной культуры МПК с помощью МАТ, МАТ+FCS, L-ФГА или Кона без разделения клеточных популяций, а также активацию сепарированной смешанной фракции CD4+ и CD8+лимфоцитов с использованием биodeградируемых наночастиц железа-декстрана, конъюгированных с МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. Так как согласно нашим исследованиям самым эффективным из представленных в данной работе способом обогащения популяции НК-клеток является однократная соинкубация МПК с фидерными клетками НЕК 293Т в начале культивирования, мы также исследовали эффективность трансдукции после активации первичной культуры МПК с помощью НЕК 293Т (Рисунок 6Б). В данной серии экспериментов по трансдукции использовали 10-кратно сконцентрированные препараты лентивирусов. Оценка экспрессии CD16-CAR проводили на 5-й день после трансдукции (Таблица 8). В данной таблице доля CD16+клеток представлена как разница значений, полученных при исследовании клеток после трансдукции и клеток из группы отрицательного нетрансдуцированного контроля.

Таблица 8 – Определение экспрессии CD16-рецептора после постановки трансдукции

Способ активации клеток	Доля CD16+клеток, %
Культура клеток Jurkat, без активации (трансдуцированный контроль)	86,2±15,2
Первичная культура МПК без разделения клеточных популяций	
МАТ	16,5±3,4
МАТ + FCS	16,1±4,3
L-ФГА	15,7±4,2
Кона	12,4±3,1
Однократная соинкубация с НЕК 293Т в начале культивирования	1,1±0,5
Фракция CD4+, CD8+лимфоцитов	
Наночастицы железа-декстрана, конъюгированные с МАТ	56,1±10,5

Доля CAR+клеток после трансдукции первичной культуры МПК всегда была достоверно ниже ($p < 0,05$), чем доля аналогичных клеток Jurkat при одинаковых условиях получения вируса. Более низкая эффективность трансдукции первичной культуры лимфоцитов по сравнению с трансдукцией клеточной линии Jurkat, вероятно, может быть объяснена большим количеством паттерн-распознающих рецепторов, в данном случае противовирусных, в цитоплазме или на поверхности МПК или CD4+, CD8+лимфоцитов, которые способны нейтрализовать вирусные частицы. Возможно также, что невысокая экспрессия CAR связана с апоптозом МПК при контакте с вирусом или обусловлена токсичностью вирусного концентрата. Самую низкую эффективность трансдукции определяли после активации с помощью НЕК 293Т, что может быть объяснено естественной устойчивостью обогащенной популяции НК-клеток к генетическим модификациям. Использование магнитной сепарации для получения фракции CD4+, CD8+лимфоцитов и ее последующая активация с применением наночастиц позволило добиться

повышения уровня экспрессии CD16-рецептора до $56,1 \pm 10,5\%$ (Рисунок 7).

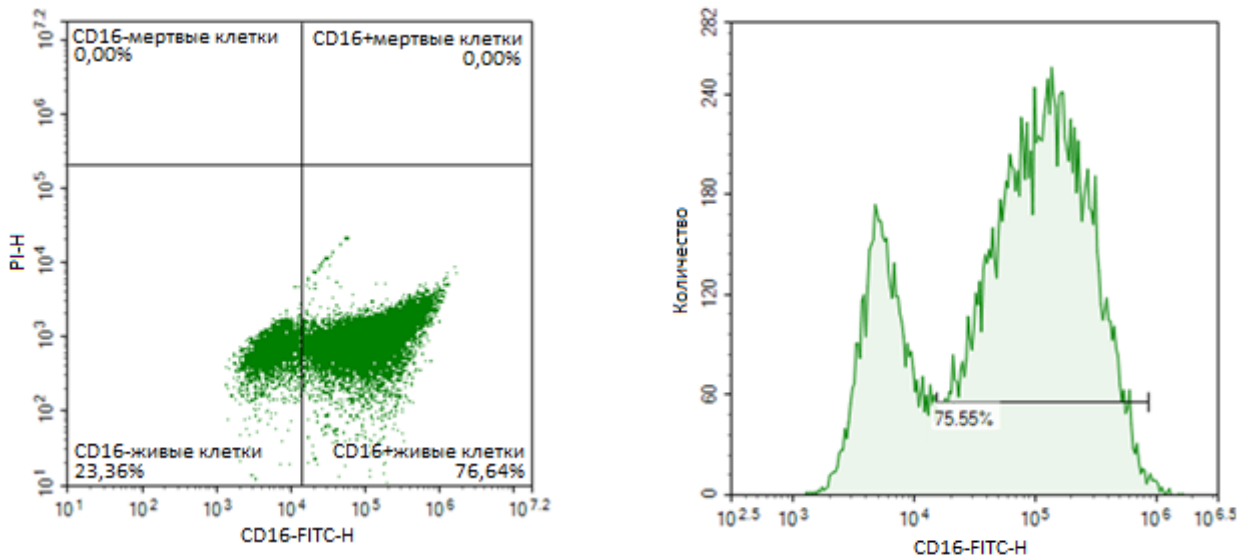


Рисунок 7 – Экспрессия CD16-CAR-рецептора на клетках МПК после трансдукции. Данные репрезентативного эксперимента

Так как процент CAR-лимфоцитов после трансдукции первичной культуры без разделения популяций был недостаточно высоким при любых используемых способах активации, было предложено проведение селекции CAR-клеток, имеющих ген устойчивости к бластицидину, который был закодирован в лентивирусном векторе. Так к клеткам первичной культуры МПК, активированным при помощи МАТ, добавляли в питательную среду антибиотик бластицидин с 7-го дня после активации и до окончания культивирования. Это позволило добиться статистически достоверного ($p < 0,05$) обогащения популяции CAR-лимфоцитов: к концу срока культивирования доля CAR-лимфоцитов составляла $88,5 \pm 7,4\%$ всей клеточной популяции. Доля CD16+лимфоцитов без селекции к концу срока культивирования была $2,2 \pm 1,7$. Таким образом, повышение доли CAR-лимфоцитов в культуре возможно и в период после трансдукции. В данной работе с успехом применяли селекцию CAR-лимфоцитов бластицидином, при которой не только выживают клетки со стабильной экспрессией, но и уничтожаются нетрансдуцированные лимфоциты.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что при длительном культивировании первичной культуры МПК, активированной МАТ, добавление ИЛ-15 к ростовой среде, содержащей ИЛ-2, приводит к увеличению общего числа лимфоцитов, но снижает их цитотоксическую активность на $12 \pm 7\%$. Наибольшая пролиферация НК- и НКТ-клеток (доля CD56+клеток составляет $60 \pm 5\%$), а также самая высокая цитотоксическая активность (процент цитотоксичности $75 \pm 5\%$) первичной культуры МПК наблюдается при использовании комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии только ИЛ-2 или комбинации ИЛ-2+ИЛ-15.

2. При сравнительном анализе воздействия МАТ, L-ФГА и Кона установлено, что наибольшая пролиферация НК-клеток (доля которых составляет $6 \pm 1\%$) отмечается при использовании L-ФГА. Наиболее выраженный прирост доли НКТ-клеток ($52 \pm 6\%$), наблюдается при активации посредством МАТ. Добавление FCS при активации лимфоцитов при помощи МАТ

приводит к увеличению количества культивируемых клеток при наибольшей в сравнении с другими режимами активации (МАТ, L-ФГА и Кона), доле CD56+лимфоцитов, составляющей $59\pm 6\%$.

3. Предварительная активация первичной культуры лимфоцитов с помощью МАТ с последующей соинкубацией с фидерными клетками НЕК 293Т на 8-й день культивирования приводит к возрастанию цитотоксической активности лимфоцитов и увеличению доли НК-клеток до $15\pm 2\%$ по сравнению с клетками, активированными только с использованием МАТ ($7\pm 1\%$). Однократная стимуляция фидерными клетками на 15-й день культивирования, а также двукратная стимуляция на 8-й и 15-й день снижают цитотоксическую активность лимфоцитов по сравнению с клетками, активированными только с использованием МАТ.

4. После активации первичной культуры лимфоцитов только фидерными клетками НЕК 293Т наблюдается увеличение экспрессии активационных маркеров CD25, CD38, CD69 на поверхности CD56+клеток, а также возрастание доли НК-клеток до $43\pm 4\%$ на 4-й день после активации по сравнению с клетками, активированными только с использованием МАТ ($15\pm 2\%$).

5. Установлено, что концентрирование вируссодержащей жидкости предпочтительнее проводить с использованием 25%-ного раствора PEG8000. Экспрессия GFP после трансфекции линии НЕК 293Т выше с применением липофектамина ($82\pm 7\%$) по сравнению с использованием кальций-фосфатного метода.

6. Показано, что самая высокая эффективность трансдукции (экспрессия CAR составляет $56\pm 10\%$) наблюдается при проведении этапа магнитной сепарации и последующей активаций лимфоцитов с помощью биodeградируемых наночастиц. Селекция CAR-лимфоцитов с помощью антибиотика бластицидина приводит к эффективному обогащению данной популяции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При культивировании первичной культуры лимфоцитов с целью повышения частоты клеточного деления и увеличения цитотоксичности требуется наличие в питательной среде таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21.

2. Для эффективного обогащения популяции НК-клеток в первичной культуре лимфоцитов человека без разделения клеточных популяций требуется этап соинкубации иммунных клеток с аллогенными фидерными клетками. Длительность культивирования не должна превышать 14 дней.

3. Для эффективного обогащения популяции НКТ-клеток в первичной культуре лимфоцитов человека без разделения клеточных популяций следует использовать МАТ к CD3-, CD28-рецепторам в начале культивирования в качестве активатора пролиферации. Оптимальной продолжительностью культивирования является 21 день.

4. С целью улучшения генетической модификации МПК предлагается разделение популяций лимфоцитов, проведение активации целевой популяции, увеличение множественности инфекции при трансдукции, а также последующая селекция CAR-лимфоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Anti-Cancer Potential of Transiently Transfected HER2-Specific Human Mixed CAR-T and NK Cell Populations in Experimental Models: Initial Studies on Fucosylated Chondroitin Sulfate Usage for Safer Treatment. Chikileva IO, Bruter AV, **Fedorova PO** [et al.] // **Biomedicines** – 2023. – Т. 11. – С. 2563. – DOI 10.3390/biomedicines11092563 [PubMed].
2. Can magnetic nanoparticles enhance adoptive cell therapy via driving migration of lymphocytes into tumors? Chikileva I, **Fedorova P**, Shubina I [et al.] // **Explor Med** – 2024. – Т. 5. – С. 351-362. – DOI 10.37349/emed.2024.00224 [PubMed].
3. Hexagonal BN/Methylene Blue Heterostructures for Local Photodynamic Therapy of Melanoma. D. S. Kalugina, A. T. Matveev, **P. O. Fedorova** [et al.] // **Ceramics International** – 2024. – Т. 50. – С. 55363-55371. – DOI 10.1016/j.ceramint.2024.10.394 [PubMed].
4. CAR НК-терапия: методы активации и экспансии НК-клеток. **Фёдорова П.О.** // **Acta Biomedica Scientifica** – 2024. Т. 5. – С. 53-65. – DOI 10.29413/ABS.2024-9.5.6.
5. Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров. **Фёдорова П.О.**, Чикилева И.О. // **Российский биотерапевтический журнал** – 2025. Т. 2. – С. 22-31. – DOI 10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31.
6. Использование клеточной линии НЕК 293Т в качестве активатора пролиферации НК-клеток в контексте разработки CAR-НК-терапии. **Фёдорова П.О.**, Чикилева И.О., Киселевский М.В. // **Инфекция и иммунитет** – 2025. Т. 15. – № 5. – С. 855-870. – DOI 10.15789/2220-7619-CNT-17941.
7. Особенности экспансии и иммунофенотипа первичной культуры НК- и НКТ-клеток человека под действием различных активаторов пролиферации. **Фёдорова П.О.**, Чикилева И.О., Токатлы А.И. [и др.] // **Российский биотерапевтический журнал** – 2025. Т. 4. – С. 64–76. – DOI 10.17650/1726-9784-2025-24-4-64-76.
8. Оптимизация метода лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов. **Фёдорова П.О.**, Чикилева И.О., Персиянцева Н.А. [и др.] // **Имунопатология, аллергология, инфектология** – 2025. № 3. – С. 29-39. – DOI 10.14427/jipai.2025.3.29.
9. Киселевский М.В., Чикилева И.О., **Фёдорова П.О.** [и др.]. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Биомедицинский клеточный продукт для терапии злокачественных новообразований. Патент № 2813531 РФ, № 2023111306, Заявл. 02.05.2023; Оpubл. 13.02.2024, Бюл. №5.
10. Преимущества и недостатки обогащения популяций натуральных киллеров для адоптивной терапии опухолей путем их избирательного наращивания без сепарации. **Шатунова П.О.**, Чикилева И.О. // Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы. Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова с международным участием. Москва, 2023.
11. Эффекторные лимфоциты с HER2-специфическим рецептором в качестве потенциального препарата в комплексной терапии злокачественной меланомы. Персиянцева Н.А., Замкова М.А., **Шатунова П.О.** [и др.] // Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы. Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова с международным участием. Москва, 2023.
12. Преимущества и недостатки обогащения популяций натуральных киллеров для адоптивной терапии опухолей путем их избирательного наращивания без сепарации. **Шатунова П.О.**, Чикилева И.О., Маркушин С.Г. // New approaches in the field of microbiology, virology, immunology and epidemiology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной

конференции, посвященной 300-летию РАН. ФГБНУ Научноисследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Москва, 2023.

13. CAR-НК-терапия: влияние активаторов на степень пролиферации, выживаемость, рецепторный профиль и цитотоксическую активность НК-клеток. **Фёдорова П.О.**, Чикилева И.О. // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 2024.

14. Использование клеточной линии НЕК 293Т в качестве активатора пролиферации НК-клеток в рамках разработки CAR-НК-терапии. **Фёдорова П.О.**, Чикилева И.О. // *New approaches in the field of microbiology, virology, immunology and epidemiology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 80-летию Великой Победы. Москва, 2025.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CAR – химерный рецептор антигена
FCS – фукозилированный хондроитинсульфат
GFP – зеленый флуоресцентный белок
L-CAR – плазида pLenti-PGK-CD16-CAR
L-GFP – плазида pLenti-PGK-GFP
L-ФГА – L-фитогемагглютинин
ИЛ – интерлейкин
КонА – конканавалин А
МАТ – моноклональные антитела
МПК – мононуклеарные клетки периферической крови
НК-клетки – натуральные киллеры