

**ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ФИЛЬТРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ
КИЛЛЕРОВ**

Гельм Ю. В. ¹,

Гривцова Л. Ю. ¹,

Саяпина Е. В. ¹,

Семенова Н. С. ¹,

Мушкарина Т. Ю. ¹,

Иванов С. А. ^{1,2},

Каприн А. Д. ^{2,3,4}

¹ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия.

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», г. Москва, Россия.

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия.

⁴ Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена - филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва, Россия.

**APPLICATION OF LEUKOCYTE FILTERS TO OBTAIN A
PREPARATION OF CYTOKINE-INDUCED KILLER CELLS**

Gelm Yu. V. ^a,

Grivtsova L. Yu. ^a,

Sayapina E. V. ^a,

Semenova N. S. ^a,

Mushkarina T. Yu. ^a,

Ivanov S. A. ^{a, b},

Kaprin A. D. ^{b, c, d}

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation.

^b P. Lumumba Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation.

^c National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation.

^d P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Резюме

Способность цитокин-индуцированных киллеров (ЦИК) распознавать и лизировать опухолевые клетки продемонстрирована в доклинических исследованиях *in vitro*. На портале ClinicalTrials.gov на данный момент зарегистрировано более 600 завершенных клинических исследований, посвященных методике клеточной иммунотерапии, из них более 30 применению ЦИК. Существует множество способов получения клеточных препаратов на основе лимфоцитов. Их общим недостатком, на наш взгляд, является необходимость дополнительных заборов крови для получения клеточного препарата в больших объемах, поэтому остается актуальным разрабатывать новые подходы с учетом решения данной проблемы. Была предложена идея извлечения лимфоцитов из лейкоцитарных фильтров с последующей активацией данных клеток в условиях *in vitro*.

Целью исследования являлась оценка возможности применения лейкоцитарных фильтров в качестве источника лимфоцитов для получения больших доз клеток ЦИК.

Материалы и методы. В исследование включены данные 30 доноров. В статье подробно описана процедура извлечения лимфоцитов из лейкоцитарных фильтров. Выделенные лимфоциты культивировали в пластиковых флаконах в CO₂-инкубаторе 10-14 суток в среде на основе RPMI-1640, в которую предварительно добавили IL-2 и IL-15. Оценку уровня активации клеток проводили методами иммуноферментного анализа (ИФА) и проточной цитометрии. Оценивали субпопуляционный состав Т-, NK-, TNK-, В-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45, CD56) и маркеры активации на них (CD38 и HLA-DR) до и после активации клеток.

Результаты. Оценена возможность применения лейкоцитарных фильтров после сепарации плазмы с оставшимися на них лейкоцитами. Изучена функциональная активность извлеченных лимфоцитов и цитокиновый состав супернатантов после культивирования в полной питательной среде. Показано, что пептидный комплекс-супернатант содержал высокие дозы сигналинговых белков: IL-2, IL-6 IL-10, IFN γ , TNF α и сохранял свою функциональную активность после длительного хранения при низких температурах. Препарат является стерильным и состоит преимущественно из Т-, TNK- и NK- клеток с высоким уровнем жизнеспособности и содержит маркеры активации: HLA-DR, CD38.

Заключение. Таким образом, из одного фильтра получали до 350 млн активированных лимфоцитов и аликвоты с супернатантом. Препарат может применяться как для фундаментальных исследований, так и для проведения АИТ онкологическим больным с целью восстановления собственного потенциала противоопухолевого иммунитета пациентов. Данное количество клеточного и бесклеточного препарата является достаточным для проведения большего количества курсов АИТ без дополнительных заборов крови.

Ключевые слова: культивирование, лейкоцитарный фильтр, IL-2, IL-15, ЦИК, АИТ.

Abstract

The ability of CIK cells to recognize and lyse tumor cells has been demonstrated in preclinical studies in vitro. The ClinicalTrials.gov portal has registered over 600 completed clinical trials devoted to the method of cellular immunotherapy, including over 30 on the use of CIK. There are many ways to obtain cells drugs based on lymphocytes. Their common drawback is the need for additional blood sampling to obtain a cell preparation in large volumes, so it remains relevant to develop new approaches that take into account the solution to this problem. *The purpose of the study* was to evaluate the possibility of using leukocyte filters as a source of lymphocytes to obtain large doses of CIK. *Materials and methods.* The article describes in detail the procedure for extracting lymphocytes from leukocyte filters (30 donors). Lymphocytes were cultured in a CO₂ incubator for 10-14 days in a medium with IL-2 and IL-15. The level of cell activation was assessed by ELISA and flow cytometry. The subpopulation composition of T, NK, TNK, B lymphocytes (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45, CD56) and activation markers on them (CD38 and HLA-DR) were assessed before and after activation. *Results.* The possibility of using leukocyte filters after separation of plasma with leukocytes remaining on them was assessed. The functional activity of extracted lymphocytes and the cytokine composition of supernatants after cultivation in a complete nutrient medium were studied. Peptide complex (supernatant) contained high doses of signaling proteins: IL-2, IL-6 IL-10, IFN γ , TNF α and retained its functional activity after long-term storage at low temperatures. The drug is sterile and consists predominantly of T-, TNK- and NK-cells with a high level of viability and contains activation markers: HLA-DR, CD38. *Conclusion.* Thus, up to 350 million activated lymphocytes and aliquots with the supernatant were obtained from one filter. The drug can be used both for basic research and for administering AIT to cancer patients in order to restore the patients' own antitumor immunity potential. This amount of cellular and acellular preparation is sufficient to conduct a larger number of AIT courses without additional blood sampling.

Keywords: cultivation, leukocyte filter, IL-2, IL-15, CIK, AIT .

1 Введение

В 1991 году была проведена первая работа по получению клеточного препарата на основе цитокин-индуцированных киллеров (цик) шмидт-вольфом и его коллегами [13]. Как известно, цик (от англ. Cytokine-induced killer cell, cik) - группа эффекторных иммунных клеток, сочетающих свойства t-лимфоцитов и nk-клеток. А уже в 1999 году была подтверждена клиническая применимость цик для лечения онкологических больных [14]. Эффективность терапии цик доказана в доклинических исследованиях *in vitro* на следующих опухолевых линиях: рак почки, поджелудочной железы, надпочечников, пищевода, толстой кишки, миелома, гепатоцеллюлярная карцинома, остеосаркома и хронический миелолейкоз [13-14].

По данным fda сша (от англ. Food and drug administration – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) одобрено 43 продукта клеточной и генной терапии, что подтверждает актуальность развития клеточных технологий и высокий уровень их практического применения на зарубежном рынке [9]. Первый препарат на основе аутологичных моноклеарных клеток крови (мнк) под названием provenge (sipuleucel-t) (dendreon, usa) был зарегистрирован в 2010 году. Данный препарат предназначен для лечения метастатического гормонорезистентного рака предстательной железы. Вакцина sipuleucel-t состоит из мнк, включающих антигенпрезентирующие клетки, в том числе и дендритные клетки, нагруженные таргетным антигеном раp, являющимся наиболее представленным на поверхности раковых клеток предстательной железы. На портале clinicaltrials.gov зарегистрированы 689 завершенных на данный момент клинических исследований. Все они посвящены методике клеточной иммунотерапии [7]. Следует отметить, что уже 39 из них посвящены применению цик [8].

В мрнц им. А.ф. цыба последнее десятилетие активно ведутся исследования по изучению новых методик иммунокоррекции. Все они основаны на введении в организм онкологическим больным аутологичных лейкоцитов, которые предварительно активируют различными иммуномодуляторами *in vitro* [1-4]. Показана хорошая переносимость иммунотерапии лимфоцитами, активированными *in vitro* с помощью il-2 и il-15 [1-3]. Противоопухолевая адоптивная (от англ. Adopt – принимать, усыновлять) иммунотерапия (аит) является безопасным и эффективным методом сопроводительной терапии. Аит позволяет уменьшить количество побочных эффектов химиотерапии, улучшить показатели продолжительности безрецидивного периода и комплексного лечения больных раком [1-4].

Известно множество способов получения клеточных препаратов, основанных на лимфоцитах доноров. Данные разработки позволяют получить активированные цитотоксические клетки в условиях *in vitro* с помощью различных сред и компонентов, и у каждого изобретения своя исключительная

методика [5, 10, 11]. Во всех способах источником лимфоцитов служит периферическая кровь человека в разном объеме. Общим недостатком данных способов является необходимость дополнительных заборов крови для получения большого количества клеточной массы и поиск доноров, что затрудняет возможность осуществления более масштабного производства. Поэтому является актуальной разработка новых подходов для получения клеточного препарата в больших объемах.

В рамках данного исследования была поставлена задача: получить большие дозы - более 200 млн. Клеток за одну процедуру культивирования. Важно было не только увеличить их количество, но и нарастить активационный потенциал изучаемых клеток. То есть стояла задача получить клетки цик с высоким уровнем жизнеспособности (>90%), содержащие маркеры активации: hla-dr и cd38, и состоящие преимущественно из т-цитотоксических клеток с фенотипом cd3+cd8+ и нкт-клеток с фенотипом cd3+cd16+ и cd3+cd56+. Кроме того, важно было изучить супернатанты на содержание цитокинов, выполняющих в свою очередь функцию медиаторов межклеточных сигналов и основных регуляторов активности иммунной системы. Необходимо было не только получить супернатант (пептидный комплекс) с высоким содержанием цитокинов, продуцируемые лимфоцитами в процессе активации *in vitro*, но и обеспечить длительное хранение данного препарата для дальнейшего применения аит. Для этого авторами была предложена идея извлечения лимфоцитов из лейкоцитарных фильтров с последующей активацией данных клеток в условиях *in vitro*.

Для улучшения условий хранения гемотрансфузионных сред является методика их фильтрации через лейкоцитарные фильтры. [6]. Известно, что процедура лейкодеплеции может производиться как на этапе гемотрансфузии с применением госпитальных лейкоцитарных фильтров, так и на этапе производства путем пропускания отдельных компонентов или цельной крови через производственные лейкоцитарные фильтры. Таким образом, основная роль лейкоцитарного фильтра заключается в удалении лейкоцитов из плазмы. Далее лейкоцитарные фильтры подлежат утилизации, однако могут быть использованы для извлечения лимфоцитов и последующего их применения. В среднем из 1 мл крови донора можно выделить до 3 млн. Лимфоцитов. Один фильтр после использования может содержать несколько сотен миллионов лимфоцитов, что дает основание применять их, а не утилизировать сразу после использования, и т.к. Система является закрытой и стерильной, вероятность контаминации сводится к нулю.

2 Материалы и методы

В исследование включены данные 30 доноров в возрасте от 19 до 62 лет (сред. 43 года), 18 мужчин и 12 женщин. Объект исследования - элюированные из лейкоцитарных фильтров лимфоциты. Все доноры состоят в базе мрнц им. Цыба и проходят регулярное медицинское обследование перед каждой

процедурой сдачи крови. Кровь доноров проверяется на вич, сифилис и гепатиты в и с, группу крови, rh, общий анализ с лейкоцитарной формулой, биохимический анализ: билирубин общий, алт. Данный набор анализов является стандартом проверки донорской крови, и проводится каждому поступающему в отделение донору. Все пациенты, поступающие к нам в центр с целью проведения аит, подписывают информированное согласие.

Выделение лимфоцитов из лейкоцитарных фильтров

После завершения забора крови на донорском пункте и сепарации плазмы и клеточной части в закрытом контуре лейкоцитарные фильтры с оставшимися на них лейкоцитами запаивали и помещали в стерильные крафт пакеты. Немедленно их доставляли в лабораторию, где в стерильных условиях проводили процедуру извлечения лимфоцитов с фильтра. Для этого от фильтра стерильными ножницами отрезали запаянные трубки и подсоединяли медицинскую капельную систему с изотоническим раствором натрия хлорида в объеме 150-250 мл. Элюированные аллогенные лимфоциты собирали в стерильные пробирки объемом 50 мл путем сильного сжатия флакона с изотоническим раствором натрия хлорида и вымывания раствора с клетками через фильтр по капельной системе (рис. 1).

Элюированные клетки, разбавленные раствором хлорида натрия, наслаивали на градиент фиколла плотностью 1,077 г/см³. Далее центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30-40 мин, что позволяло осадить эритроциты и гранулоциты на дно пробирки. Образованное интерфазное кольцо лимфоцитов после центрифугирования аккуратно собирали и отмывали двукратно с помощью фосфатно-солевого буфера и применением метода центрифугирования при 1500 об/мин 10 мин. Полученные лимфоциты подсчитывали, после чего ресуспендировали в концентрации $1,5-2 \times 10^6$ кл/мл в полной питательной среде.

Питательную среду готовили на основе rpmi-1640, в которую добавляли l-глутамин, рекомбинантный человеческий альбумин, пируват натрия, в качестве источника энергии, антибиотик гентамицин и цитокины для активации клеток. В качестве цитокинов добавляли интерлейкины: человеческий рекомбинантный (р.ч.) Il-2 («ронколейкин», биотех, россия) в концентрации - 250 ме/мл и р.ч. Il-15 («активный интерлейкин 15», cloud-clone corp., сша) - 5 нг/мл.

Культивирование лимфоцитов

Выделенные лимфоциты культивировали в пластиковых флаконах с вентилируемой крышкой в со2-инкубаторе при: 37°с до 14 дней. Морфологию клеток в культуре и контроль контаминации оценивали каждый день с помощью инвертированного микроскопа eclipse ts100 (nikon, япония). В течение всего срока культивирования каждые два дня обновляли питательную

среду во флаконах с клетками, для поддержания жизнеспособности активированных лимфоцитов. При каждом пересаживании клеток подсчитывали количество лимфоцитов с помощью камеры горяева. В конце срока культивирования для определения уровня жизнеспособности изучаемых клеток окрашивали лимфоциты красителем трипановый синий (биолот, россия).

На этапах культивирования цитотоксических клеток определяли концентрацию цитокинов в супернатантах, фенотип и маркеры активации лимфоцитов, оценивали и пролиферативную активность. В конце срока культивирования клетки полностью собирали, оценивали уровень пролиферативной активности, супернатант замораживали при: -30°с. Передавали пробу в бактериологическую лабораторию на контроль стерильности (отсутствия бактерий и грибов). Активация клеток подтверждалась с помощью методов: иммуноферментного анализа (ифа) и проточной цитометрии.

Ифа супернатантов

В супернатантах на этапах культивирования после 2 дня активации, измеряли концентрации il-2, il-4, il-6, il-10, ifn γ и tnfa для определения функциональной активности клеток до и после заморозки (n=40). Ифа проводили с помощью реагентов (вектор бест, россия). На фотометре «chromate» (awareness technology, сша) измеряли оптическую плотность образцов в рекомендуемом двухволновом режиме: референс-фильтр–620 нм, основной фильтр–450 нм.

Проточная цитометрия

До и после окончания культивирования лимфоцитов определяли субпопуляционный состав суспензионных лимфоцитов и экспрессию маркеров активации (n=19). Оценивали субпопуляционный состав tnk-, т-, nk-, b-лимфоцитов (cd3, cd4, cd8, cd14, cd16, cd19, cd45, cd56) и маркеры активации на них (cd38 и hla-dr). Для фенотипирования лимфоциты отмывали фосфатно-солевым буфером методом центрифугирования и окрашивали конъюгированными с ре или fitc антителами к cd3, cd4, cd8, cd16, cd19, hla-dr, cd38, cd56 (beckman coulter, франция). Фенотипирование флуоресцентно меченых клеток проводили на цитофлуориметре facscanto ii (becton dickinson, сша). Анализировали не менее 5000 событий в секторе живых клеток-мишеней.

Статистика

С помощью программы microsoft excel 2007 проводили статистическую обработку данных. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения по группе или среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Статистически значимые различия определяли с помощью непараметрического u-критерия манна-уитни.

2 Результаты

Информация о донорах

В исследовании принимали участие 30 доноров, из них 12 человек имели i+ группу крови, 9 человек - ii+, 3 человека - ii-, 4 человека - iii+ и по 1 человеку имели iii- и iv- группу крови. По результатам проведенных лабораторных анализов все исследованные показатели укладывались в референсный диапазон. Ниже представлены усредненные данные по группе доноров (табл. 1).

Культивирование лимфоцитов

Лимфоциты получали из лейкоцитарных фильтров (n=30). При оценке морфологии клеток наблюдали, что со 2-го дня активации часть лимфоцитов адгезировала к культуральному пластику. Клетки увеличивались в размерах и пролиферировали. В течение всего срока роста клеток большинство сохраняло морфологию больших гранулярных лимфоцитов. Самопроизвольное отлипание лимфоцитов от пластика флакона наблюдалось

После 8-9 суток, что указывает на завершение процесса активации клеток *in vitro*. Уровень жизнеспособности клеток в конце культивирования составлял $96,7 \pm 0,6\%$. Количество клеток к окончанию активации увеличивалось в 1,5-2 раза. Таким образом, из одного лейкоцитарного фильтра удавалось выделить 120-200 млн. Лимфоцитов, а после культивирования 10-14 суток удавалось получить до 350 млн. Активированных лимфоцитов.

Следует отметить, что все пробы, прошедшие проверку в бактериологической лаборатории на отсутствие бактерий и грибов, были стерильны, что подтверждает успех данной методики, т.к. Данный препарат является безопасным и может быть применен для проведения аит.

Далее представлены результаты оценки функциональной активности данного препарата. Изучали активацию клеток с помощью метода проточной цитометрии и цитокиновый состав супернатантов методом ифа.

Проточная цитометрия

Показано, что препарат с живыми клетками в основном содержал т-клетки (cd3+cd45+), т-хелперы (cd3+cd4+), т-цитотоксические лимфоциты (cd3+cd8+), b-клетки (cd19+cd45+), tnk-клетки (cd3+cd16+, cd3+cd56+), nk-клетки (cd3-cd16+cd56+). Таким образом, популяции т-, nk-, tnk- клеток являются преобладающими, более 90% от всех клеток препарата, что было типично для гетерогенной популяции цик. При сравнении фенотипической картины элюированных с фильтров лимфоцитов до и после культивирования в полной питательной среде с цитокинами достоверно выявлено следующее

(табл. 2). Наблюдали прирост т-клеток (cd3+cd45+) на 11,9% ($p \leq 0,01$), т-цитотоксических лимфоцитов (cd3+cd8+) на 9,0% ($p \leq 0,05$). Количество tnk-клеток (cd3+cd16+) увеличилось в среднем по группе на 11,3%, а tnk-клеток (cd3+cd56+) на 9,1%, то есть в 2,5 ($p \leq 0,05$) и 2,4 раза ($p \leq 0,01$), соответственно. Прослеживалось нарастание экспрессии активационных рецепторов, а именно отмечали значительный рост активированных лимфоцитов cd38+ на 23,8% ($p \leq 0,01$) и hla-dr+ на всех лимфоцитах в 2,3 раза ($p \leq 0,01$). Уровни активированных т-лимфоцитов: cd3+cd38+ и hla-dr+cd3+ увеличивались в 3,4 и 5,7 раз ($p \leq 0,01$), соответственно.

Таким образом, показано, что представленным способом, возможно получить лимфоциты с маркерами активации: hla-dr и cd38. Полученный клеточный препарат состоит преимущественно из т-цитотоксических клеток (cd3+cd8+), т-хелперов (cd3+cd4+) и nkt-клеток (cd3+cd16+ и cd3+cd56+), которые, как известно, имеют свойство оказывать сильное воздействие на клетки-мишени.

Ифа супернатантов

Изучали супернатанты, собранные на 2-е, 5-е и 9-е сутки культивирования клеток ($n=40$). При анализе всех образцов были зафиксированы следующие максимальные значения: il-2 – 746 пг/мл, il-4 – 27 пг/мл, il-6 – 650 пг/мл, il-10 – 1087 пг/мл, ifn γ – 1715 пг/мл, tnfa – 1408 пг/мл. В среднем супернатанты содержали il-2 - 327,8 пг/мл (медиана (ме) - 324,5 пг/мл), il-4 – 2,9 пг/мл (ме - 2,0 пг/мл), il-6 - 448,1 пг/мл (ме – 432,5,0 пг/мл), il-10 - 300,4 пг/мл (ме - 187,0 пг/мл), ifn γ - 905,6 пг/мл (ме - 928,5 пг/мл), tnfa 504,7 пг/мл (ме - 402,5 пг/мл). Данный разброс значений объясняется персональными характеристиками клеток каждого донора и индивидуальным ответом на стимуляцию *in vitro*.

При анализе результатов по дням культивирования наблюдали, что уровень il-2 оставался примерно одинаковым на протяжении всего срока культивирования, il-6 увеличивался незначительно (в 1,5 раза) к окончанию активации, а ifn γ и tnfa был максимален уже на 2-е сутки (рис. 2). Содержание il-4 было обнаружено в следовых количествах, что не представляет особого интереса для анализа полученных результатов.

Таким образом, супернатанты, полученные путем стимуляции элюированных с фильтров лимфоцитов предлагаемым способом в процессе активации *in vitro* продуцируют в среду достаточно высокие уровни цитокинов. Кроме того, до и после заморозки содержание цитокинов: il-2, il-6, il-10, ifn γ и tnfa существенно не менялось ($p < 0,05$). Это дает основание заключить, что препарат не теряет своей функциональной активности при замораживании до -30°С и может применяться как пептидный комплекс для аит в качестве медиаторов межклеточных сигналов.

Проведение аит препаратом, полученным из фильтров

Для проведения одной инъекции пациенту, необходимо подготовить клеточный препарат, в количестве 5-10 млн. Ресуспендированных в объеме 1,3-2,0 мл супернатанта или физиологического раствора. Супернатант также собирали отдельно в объеме до 2,0 мл. Клеточный и/или бесклеточный препарат вводили онкологическому больному паравертебрально внутрикожно в 2-8 точек и отслеживали местную реакцию. На месте внутрикожного введения препарата возможна гипертермия, гиперемия, припухлость и небольшая болезненность. О начале иммунного ответа на введение лимфоцитов может указывать возможное незначительное повышение температуры тела или гриппоподобный синдром. В результате наблюдали отчетливые реакции гиперчувствительности немедленного типа, даже у пациентов со сниженным иммунологическим статусом. Предполагается, что после многократной вакцинации у больного формируется напряженный противоопухолевый иммунный ответ, способствующий элиминации раковых клеток.

Курс состоит из 10 таких инъекций клеточного и бесклеточного препарата. Из одного фильтра получали 180-350 млн активированных лимфоцитов и аликвоты с супернатантами. Данное количество клеточного и бесклеточного препарата является достаточным для проведения 3-7 курсов аит.

3 Обсуждение

Существуют данные о том, что цик обладают более высокой противоопухолевой цитотоксической активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*, чем лимфокин-активированные киллеры (лак), генерируемые из мнк при инкубации с *il*-2 [15]. На примере сравнительного анализа доклинических исследований корейскими учеными, можно отметить эффективность цик против различных опухолевых клеток, таких как клетки гепатомы, лейкемии, рака легких, яичников, почек, желудка [12]. В своих исследованиях ученые показали, что цик обладают выраженной противоопухолевой активностью против меланом *in vitro* и в модели ксенотрансплантата человеческой опухоли *in vivo* без какой-либо токсичности. Ученые описали факт ингибирования роста опухоли в зависимости от доз введенных цик [12]. В проведенных нами ранее исследованиях также была отмечена хорошая переносимость иммунотерапии активированными лимфоцитами. Эффективность данной методики в качестве сопроводительной терапии показана на группах пациентов с такими онкологическими заболеваниями как: меланома, рак толстой кишки, желудка, пищевода, легкого, предстательной, поджелудочной и молочной железы [1-4].

Поскольку цик можно легко размножить из лимфоцитов с помощью коктейля стимуляторов, они остаются одним из самых популярных и надежных вариантов для иммунотерапии рака [3, 4, 12, 15]. Кроме того, цик неоднородны по своей природе, и их можно легко охарактеризовать

фенотипически. Лимфоциты активируются сигналинговыми белками - цитокинами с целью создания каскада иммунных реакций направленного противоопухолевого типа. Фактически появляется возможность перенесения готового каскада реакций, побуждающих иммунные клетки пациента восстановить своё природное предназначение - находить и убивать опухолевые клетки, тем самым восстанавливать собственный потенциал противоопухолевого иммунитета пациента.

Проведенное исследование помогло разработать и наладить способ получения клеточного и бесклеточного препаратов для аит из лейкоцитарных фильтров. Была изучена функциональная активность лимфоцитов и цитокиновый состав супернатантов. Оценена возможность длительного хранения бесклеточного препарата и оптимально подобрана схема проведения аит активированными лимфоцитами и пептидным комплексом.

4 Заключение

Оценена возможность применения лейкоцитарных фильтров после сепарации плазмы с оставшимися на них лейкоцитами. Фильтры можно применять в качестве источника клеток для получения цик в условиях *in vitro* для аит. Данную методику можно рекомендовать, если соблюдены все условия стерильности при извлечении и активации клеток. Полученные данным способом цик могут применяться как для фундаментальных исследований, так и для проведения аит онкологическим больным. Разработанная методика позволяет получать большие дозы клеточного препарата цик и бесклеточного препарата (пептидного комплекса), имеющего длительный срок хранения, что избавляет от необходимости в дополнительных заборах крови для получения новых порций препарата. Препарат является стерильным и состоит из т-клеток (cd3+cd45+), т-хелперов (cd3+cd4+), т-цитотоксических (cd3+cd8+), тнк-клеток (cd3+cd16+, cd3+cd56+), nk-клеток (cd3-cd16+cd56+) и содержит маркеры активации на лимфоцитах: hla-dr+, cd38+. Популяции т-, тнк- и nk-клеток составляют более 90% от всех клеток препарата, и имеют высокий уровень жизнеспособности (>96%). Пептидный комплекс содержит высокие дозы сигналинговых белков: il-2, il-6 il-10, ifn γ , tnfa, продуцируемые лимфоцитами в процессе активации *in vitro*. Методом ифа показано, что после разморозки супернатант не теряет своей функциональной активности. Это позволяет хранить бесклеточный препарат при -30°c для последующего использования в амбулаторном лечении с целью восстановления собственного потенциала противоопухолевого иммунитета пациента.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Результаты обследования доноров (n=30).

Table 1. Results of survey of donors (n=30).

Анализ Analysis	Единицы измерения Units of measurement	Референсный интервал Reference interval	Результат Result (n=30)
ВИЧ/ сифилис/ гепатиты В и С HIV/ syphilis/ hepatitis B and C	-	отрицательно	отрицательно
лейкоциты Leukocytes	10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	4,1-8,8	6,2
лимфоциты lymphocytes	%	19,0-37,0	34,2
лимфоциты (абс.) lymphocytes (abs.)	10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	1,2-3,0	2,0
моноциты monocytes	%	3,0-11,0	9,3
моноциты (абс.) monocytes (abs.)	10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	0,1-0,6	0,6
тромбоциты platelets	10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	180-320	270,0
гемоглобин hemoglobin	г/л g/l	132-164	150,6
билирубин общий bilirubin total	мкмоль/л μmol/l	1,7-20,0	8,9
АЛТ ALT	Ед/л U/l	0,0-41,0	21,4

Таблица 2. Результаты фенотипирования исследуемых клеток (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, n=19).

Table 2. The results of phenotyping of the studied cells (mean $\pm$ standard deviation, n=19).

Показатель Indicator	До активации Before activation (n=19) %	После активации After activation (n=19) %
Т-клетки T-cells CD3+CD45+	64,2$\pm$10,5	76,1$\pm$14,8
Т-хелперы T-helper cells CD3+CD4+	38,4 $\pm$ 9,2	36,8 $\pm$ 12,9
Т-цитотоксические T-cytotoxic cells CD3+CD8+	19,7$\pm$9,4	28,7$\pm$12,5
TNK-клетки TNK-cells CD16+CD3+	7,4$\pm$7,0	18,7$\pm$14,8
TNK-клетки TNK-cells CD56+CD3+	6,5$\pm$6,7	15,6$\pm$17,2
NK-клетки NK-cells CD3-CD56+CD16+	10,4 $\pm$ 6,6	6,8 $\pm$ 6,8

В-клетки B-cells CD19+CD45+	6,4±3,9	7,0±9,5
Активированные лимфоциты Activated lymphocytes CD38+	29,9±9,4	53,7±16,6
Активированные Т-лимфоциты Activated T-lymphocytes CD3+CD38+	12,3±11,1	41,3±18,5
Активированные лимфоциты Activated lymphocytes HLA-DR+	17,2±7,1	39,5±13,3
Активированные Т-лимфоциты Activated T-lymphocytes HLA-DR+CD3+	5,6±4,9	32,0±13,8
Активированные НК-клетки Activated NK-cells CD38+CD16+	7,0±4,1	5,3±6,1
Активированные НК-клетки Activated NK-cells HLA-DR+CD16+	1,4±2,5	4,5±6,8

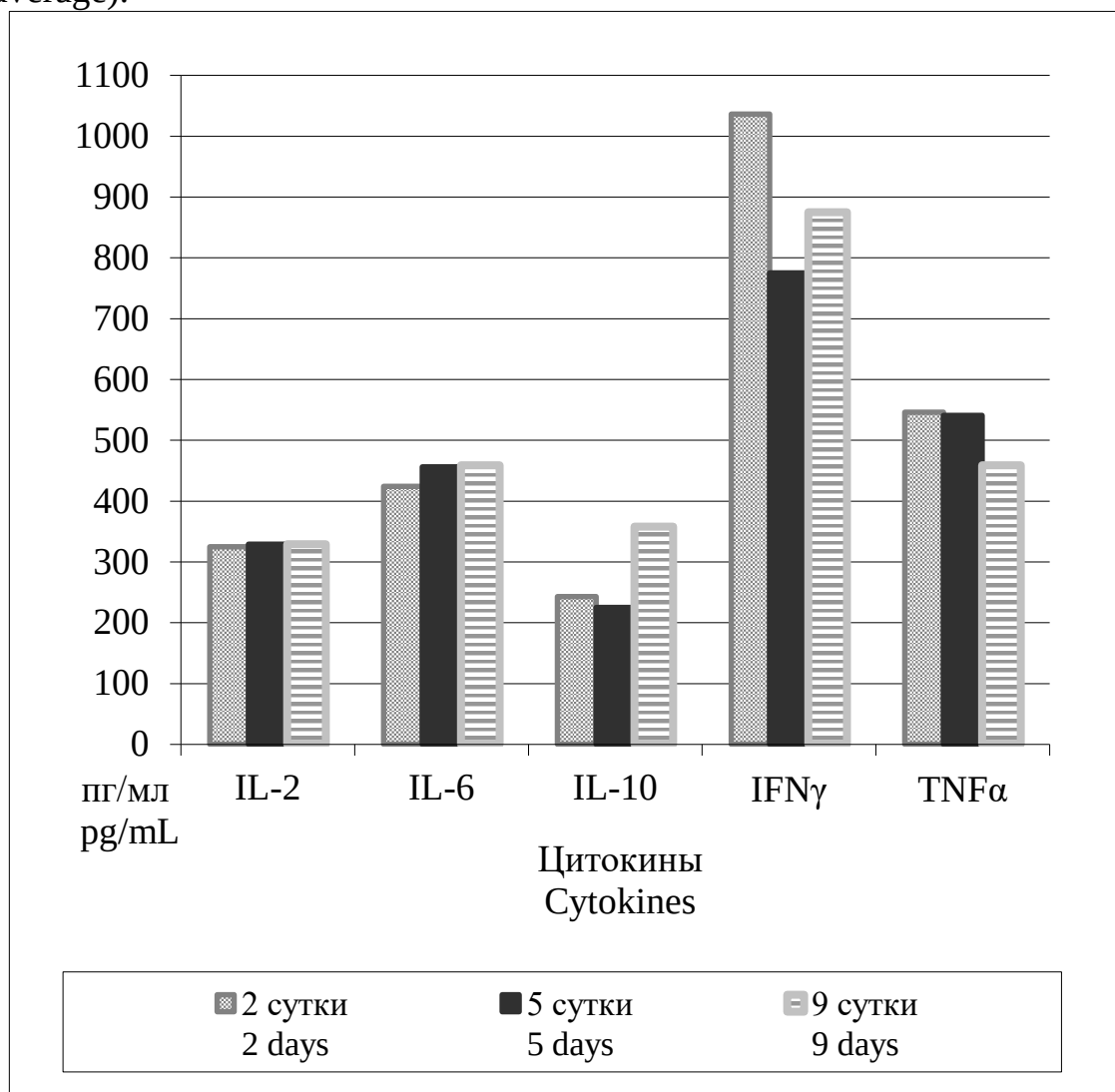
РИСУНКИ

Рисунок 1. Процесс промывания фильтра - элюирование лейкоцитов донора.
Figure 1. The process of washing the filter - elution of donor leukocytes.



Рисунок 2. График зависимости уровня цитокинов от дня стимуляции клеток (в среднем по группе).

Figure 2. Graph of the dependence of cytokine levels on the day of cell stimulation (group average).



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Гельм Ю.В. – научный сотрудник отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия;

адрес: 249031, Россия, г. Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10;

телефон: +7(48439)2-96-04;

e-mail: julia_marizina@mail.ru

Gelm Yu.V., Research Associate, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation;

address: 10 Marshal Zukov St, Obninsk, 249031, Russian Federation;

telephone: +7(48439)2-96-04;

e-mail: julia_marizina@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Гривцова Л.Ю. – д.б.н., заведующая отделением клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия;

Grivtsova L.Yu., PhD, MD (Biology), Head, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation;

Саяпина Е.В. – к.м.н., заведующий отделением трансфузиологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия;

Sayapina E.V., PhD (Medicine), Head, Department of Transfusiology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation;

Семенова Н.С. младший научный сотрудник отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия;

Semenova N.S., junior researcher, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation;

Мушкарина Т.Ю. - научный сотрудник отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия;

Mushkarina T.Yu., Research Associate, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation;

Иванов С.А. – д.м.н., член-корр. РАН, директор Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск; профессор кафедры онкологии и рентгенорадиологии имени В.П. Харченко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», г. Москва, Россия;

Ivanov S.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Obninsk; Professor, V. Kharchenko Department of Oncology and Radiology, P. Lumumba Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;

Каприн А.Д. - д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск; заведующий кафедрой онкологии и рентгенорадиологии им. В.П. Харченко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», г. Москва; директор Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва, Россия;

Kaprin A.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Radiological Center of the Russian Federation, Obninsk; Director, P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, a Branch of National Medical Research Radiological Centre of the Russian Federation, Moscow; Head, V. Kharchenko Department of Oncology and Radiology, P. Lumumba Peoples.

Блок 3. Метаданные статьи

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ФИЛЬТРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ КИЛЛЕРОВ

APPLICATION OF LEUKOCYTE FILTERS TO OBTAIN A PREPARATION OF
CYTOKINE-INDUCED KILLER CELLS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ПОЛУЧЕНИЕ ЦИК ИЗ ЛЕЙКОФИЛЬТРОВ

OBTAINING CIK FROM LEUKOFILTERS

Ключевые слова: культивирование, лейкоцитарный фильтр, IL-2, IL-15, ЦИК, АИТ.

Keywords: cultivation, leukocyte filter, IL-2, IL-15, CIK, AIT.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 8,

Количество таблиц – 2,

Количество рисунков – 2.

26.05.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1	Абакушина Е.В., Гельм Ю.В., Пасова И.А., Бажин А.В. Иммунотерапевтические подходы к лечению больных колоректальным раком // Биохимия, 2019. Т. 84, № 7. С. 923-933.	Abakushina E.V., Gel'm Yu.V., Pasova I.A., Bazhin A.V. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer. Biokhimiya = Biochemistry, 2019, Vol. 84, no. 7, pp. 720-728. (In Russ.)	doi: 10.1134/S0320972519070042 doi: 10.1134/S0006297919070046
2	Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Пасова И.А., Каприн А.Д., Неприна Г.С. Способ лечения онкологических больных цитотоксическими лимфоцитами. Патент RU 2596505 C1, 10.09.2016.	Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Pasova I.A., Kaprin A.D., Neprina G.S. A method for treating cancer patients with cytotoxic lymphocytes. Patent RU 2596505 C1, 10.09.2016.	https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2596505&TypeFile=html
3	Гельм Ю.В., Абакушина Е.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю. Разработка подходов к клеточной иммунотерапии онкологических больных // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 381-388.	Gel'm Yu.V., Abakushina E.V., Pasova I.A., Grivtsova L.Yu. Development of approaches for cellular immunotherapy of cancer patients. Medical Immunology (Russia)	doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2135
4	Гельм Ю.В., Кузьмина Е.Г., Абакушина Е.В. Функциональная активность лимфоцитов здоровых доноров и онкологических больных при культивировании в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-	Gel'm Yu.V., Kuz'mina E.G., Abakushina E.V. Functional activity of lymphocytes of healthy donors and cancer patients after culturing with IL-2	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37196972

	15 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2019 г. Т. 167, № 4. С. 471-477.	and IL-15. Medicine and Biology Experimental of Bulletin. 2019. V. 167, №4. P. 486-491.	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43203784
5	Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Соснов А.В. Способ получения активированных моноклеарных лейкоцитов. Патент RU 2402338 C1, 27.10.2010.	Kiselevsky M.V., Anisimova N.Yu., Sosnov A.V. Method for obtaining activated mononuclear leukocytes. Patent RU 2402338 C1, 10.27.2010	https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2402338&TypeFile=html
6	Мельникова В.Н., Селиванов Е.А., Кирьянова Г.Ю., Ефимова Т.А. Метод заготовки лейкофильтрованных отмытых эритроцитов // Трансфузиология, 2010. Т. 11, №3. С. 4-10.	Melnikova V.N., Selivanov E.A., Kiryanova G.U., Efimova T.A. The method of preparation of leukodepleted washed red blood cells. Transfusiology. 2010. V. 11, №3. P. 4-11.	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21654223
7	Национальная медицинская библиотека: официальный сайт правительства США, результаты поиска: клеточная иммунотерапия. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/search?intr=cellular%20immunotherapy&aggFilters=status:com/ (дата обращения: 31.01.2025)	NIH National Library of Medicine: official website of the USA government, Search Results: cellular immunotherapy. [Electronic resource]. Available at: https://clinicaltrials.gov/search?intr=cellular%20immunotherapy&aggFilters=status:com/ (access date: 31.01.2025)	https://clinicaltrials.gov/search?intr=cellular%20immunotherapy&aggFilters=status:com
8	Национальная медицинская библиотека: официальный сайт правительства США, результаты поиска: ЦИК. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/search?intr=CIK/ (дата обращения: 31.01.2025)	NIH National Library of Medicine: official website of the USA government, Search Results: CIK. [Electronic resource]. Available at: https://clinicaltrials.gov/search?intr=CIK/ (access date: 31.01.2025)	https://clinicaltrials.gov/search?intr=CIK

	доступа: https://clinicaltrials.gov/search?intr=CIK/ (дата обращения: 31.01.2025)		
9	Одобрённые продукты клеточной и генной терапии: официальный сайт правительства США. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products/ (дата обращения: 31.01.2025)	Approved Cellular and Gene Therapy Products, FDA.gov: official website of the USA government. [Electronic resource]. Available at: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products/ (access date: 31.01.2025)	https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products
10	Свадовский А.И., Пушкина Е.А., Гуляев М.М. Способ лечения внутримозговой опухоли головного мозга. Патент RU 2201762 C1, 10.04.2003.	Svadovsky A.I., Pushkina E.A., Gulyaev M.M. Method for treating intracerebral brain tumor. Patent RU 2201762 C1 04.10.2003.	https://www.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=8e523719840251c989bdd8e7833a41c4
11	Чикилева И.О., Анисимова Н.Ю., Верескунова Н.В., Киселевский М.В. Способ получения активированных лейкоцитов для адъювантной адаптивной иммунотерапии злокачественных новообразований. Патент RU 2414915 C2, 27.03.2011.	Chikileva I.O., Anisimova N.Yu., Vereskunova N.V., Kiselevsky M.V. Method for obtaining activated leukocytes for adjuvant adaptive immunotherapy of malignant neoplasms: Patent RU 2414915 C2, 03.27.2011.	https://www.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=79b0e4aecda412639585e9a6ace29f58
12	Kim J.S., Kim Y.G., Pyo M., Lee H.K., Hong J.T., Kim Y., Han S.B. Adoptive cell	Kim J.S., Kim Y.G., Pyo M., Lee H.K., Hong J.T., Kim Y., Han S.B. Adoptive cell therapy of	doi: 10.4110/in.2015.15.2.58

	therapy of melanoma with cytokine-induced killer cells. <i>Immune Network</i> . 2015. - 15(2), pp. 58-65.	melanoma with cytokine-induced killer cells. <i>Immune Network</i> . 2015. - 15(2), pp. 58-65.	
13	Schmidt-Wolf I. G., Negrin R. S., Kiem H. P., Blume K. G., Weissman I. L. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. <i>J. Exp. Med</i> . 1991. - №174 (1), pp. 139–149.	Schmidt-Wolf I. G., Negrin R. S., Kiem H. P., Blume K. G., Weissman I. L. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. <i>J. Exp. Med</i> . 1991. - №174 (1), pp. 139–149.	doi: 10.1084/jem.174.1.139
14	Schmidt-Wolf I.G., Finke S., Trojanek B., Denkena A., Lefterova P., Schwella N., Heuft H.G., Prange G., Korte M., Takeya M., Dorbic T., Neubauer A., Wittig B., Huhn D. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma. <i>Br. J. Cancer</i> . 1999. -81, pp. 1009–1016.	Schmidt-Wolf I.G., Finke S., Trojanek B., Denkena A., Lefterova P., Schwella N., Heuft H.G., Prange G., Korte M., Takeya M., Dorbic T., Neubauer A., Wittig B., Huhn D. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma <i>Br. J. Cancer</i> . 1999. -81, pp. 1009–1016.	doi: 10.1038/sj.bjc.6690800
15	Wang F. Sh., Liu M.X., Zhang B., Shi M., Lei Zh.Y., Sun W.B., Du Q.Y., Chen J.M. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. <i>World J. Gastroenterol</i> . 2002. - 8(3), pp. 464-468.	Wang F.Sh., Liu M.X., Zhang B., Shi M., Lei Zh.Y., Sun W.B., Du Q.Y., Chen J.M. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. <i>World J. Gastroenterol</i> . 2002. - 8(3), pp. 464-468.	doi: 10.3748/wjg.v8.i3.464

