



Вашкевич Е.П.✉, Мигас А.А., Ласюков Е.А., Шман Т.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Оптимизация технологии экспансии естественных киллерных клеток для целей иммунотерапии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Вашкевич Е.П. – экспансия, иммунофенотипирование, измерение концентрации метаболитов, анализ данных, написание статьи; Мигас А.А. – получение фидерных клеток, редактирование статьи; Ласюков Е.А. – иммунофенотипирование, измерение концентрации метаболитов; Шман Т.В. – дизайн исследования, анализ данных, редактирование статьи.

Подана: 26.09.2022

Принята: 14.11.2022

Контакты: katsiaryna.vashkevich@gmail.com

Резюме

Введение. Для повышения эффективности противоопухолевой адоптивной иммунотерапии с использованием естественных киллерных (ЕК) клеток необходимо получение их большого количества. С этой целью могут быть использованы различные системы для экспансии клеток, начиная от стандартных культуральных флаконов и заканчивая закрытыми автоматическими приборами, каждая из систем обладает своими особенностями, преимуществами и недостатками.

Цель. Оптимизировать технологию экспансии ЕК-клеток с использованием флаконов, содержащих газопроницаемые мембраны, с последующим масштабированием для целей иммунотерапии.

Материалы и методы. ЕК-клетки получали в ходе экспансии мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови доноров в присутствии интерлейкина (ИЛ) 2 и облученных фидерных клеток K-562-4-1BBL-мИЛ-21 в стандартных Т-флаконах и флаконах с газопроницаемой мембраной (G-Rex). На этапах экспансии оценивали количество клеток, их жизнеспособность, субпопуляционный состав, концентрацию метаболитов в ростовой среде.

Результаты. При проведении масштабирования процесса экспансии для иммунотерапии во флаконах G-Rex100M получили клеточный продукт с абсолютным ($1,55 \times 10^9$) и относительным (95,3%) содержанием CD3-CD56+ лимфоцитов, сравнимым с содержанием таких клеток в продукте, экспандированном в Т-флаконах. При этом прирост ЕК-клеток в G-Rex был достоверно выше (в 551 раз за 11 суток) по сравнению со стандартными флаконами (в 130 раз за 16 суток). Установлены критерии завершения процесса экспансии в G-Rex: концентрация глюкозы менее 2 ммоль/л, лактата – более 12 ммоль/л.

Заключение. Оптимизированы условия проведения экспансии ЕК-клеток во флаконах G-Rex100M, позволяющие получить необходимое количество целевых клеток для клинического использования.

Ключевые слова: ЕК-клетки, экспансия, G-Rex, глюкоза, лактат, иммунотерапия



Vashkevich K.✉, Migas A., Lasiukov Y., Shman T.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Optimization of Natural Killer Cell Expansion Technology for Immunotherapy

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Vashkevich K. – expansion, immunophenotyping, metabolites concentration measurement, data analysis, article writing; Migas A. – feeder cells generation, article editing; Lasiukov Y. – immunophenotyping, metabolites concentration measurement; Shman T. – study design, data analysis, article editing.

Submitted: 26.09.2022

Accepted: 14.11.2022

Contacts: katsiaryna.vashkevich@gmail.com

Abstract

Introduction. To increase the effectiveness of antitumor adoptive immunotherapy using natural killer (NK) cells, it is crucial to get a sufficient NK cell number. There are various cell expansion devices, ranging from standard culture flasks to closed automatic systems. Each of them has its own characteristics, advantages and disadvantages.

Purpose. Optimization of NK cell expansion technology using flasks containing gas-permeable membranes, followed by scaling for immunotherapy purposes.

Materials and methods. NK cells were obtained by expanding donor peripheral blood mononuclear cells in the presence of interleukin (IL) 2 and irradiated feeder cells K-562-4-1BBL-mIL-21 in standard T-flasks and flasks with a gas-permeable membrane (G-Rex). Number of cells, viability, subpopulation composition, and the concentration of metabolites in the growth medium were evaluated during expansion.

Results. As a result of scaling of NK cell expansion process for G-Rex100M flasks we obtained product with an absolute (1.55×10^9) and relative (95.3%) content of CD3–CD56+ lymphocytes comparable to the product acquired from T-flask. We observed that culture in G-Rex flasks allowed more efficient and rapid NK cell expansion compared with T-flasks (551 in 11 days vs 130 in 16 days). The following criteria were established for expansion process completion in G-Rex: glucose level less than 2 mmol/L and lactate level more than 12 mmol/L.

Conclusion. The conditions for NK cell expansion in G-Rex100M flasks have been optimized to provide the required number of target cells for clinical use.

Keywords: NK cells, expansion, G-Rex, glucose, lactate, immunotherapy

■ ВВЕДЕНИЕ

Естественные киллерные (ЕК) клетки являются частью врожденного звена иммунитета, способны распознавать и элиминировать опухолевые мишени без предварительной сенсibilизации и активно используются для проведения адоптивной иммунотерапии онкологических заболеваний [1]. Одним из методов получения данной группы лимфоцитов является ex vivo экспансия в присутствии генетически

модифицированной линии K-562, экспрессирующей на своей поверхности молекулы 4-1BBL и ИЛ-15 или ИЛ-21. ЕК-клетки, полученные таким способом, применяют в клинических исследованиях у пациентов с лейкозами, множественной миеломой, нейробластомой и др. [2].

Повысить эффективность иммунотерапии ЕК-клетками, в частности в группе пациентов с рецидивами и рефрактерными формами лейкозов, можно за счет многократных инфузий клеток при проведении одного или нескольких курсов терапии. Так, в работе испанских исследователей проводили по два курса ЕК-иммунотерапии с двумя введениями клеток на курс с медианой дозы ЕК $6,8 (0,6-34,2) \times 10^6/\text{кг}$, клинический ответ был отмечен у 72% пациентов [3]. Бразильские врачи исследовали схему 6-кратного введения замороженных ЕК-клеток на один курс, дозы которых составили $1-10 \times 10^6/\text{кг}$, при этом общий клинический ответ был получен у 78,6% пациентов [4]. Таким образом, можно предположить, что для наилучшей терапевтической эффективности необходимо получение большого количества ЕК-клеток.

Для этих целей актуальным является не только исследование методов стимуляции ЕК-клеток, но и изучение вклада различных систем для экспансии. Для генерации ЕК-клеток используют стандартные культуральные флаконы Т-типа, газопроницаемые мешки и флаконы G-Rex, биореакторы или закрытые автоматические системы [5]. Экспансия клеток во флаконах Т-типа, которые нами активно использовались ранее, имеет ряд недостатков. К ним относят необходимость частой смены среды и пересева клеток, большой расход флаконов для получения достаточного количества клеток, увеличение числа манипуляций и рисков микробной контаминации в процессе культивирования. Флаконы типа G-Rex (gas-permeable rapid expansion) можно рассматривать как биореакторы, принцип технологии которых заключается в наличии проницаемой для газов силиконовой мембраны на дне флакона, что обеспечивает оптимальный газообмен для клеток и избавляет от необходимости помешивания, качания и перфузии, как в других типах биореакторов [6]. Также преимуществами системы G-Rex являются: отсутствие потребности в специальном оборудовании, сокращение времени на проведение манипуляций, получение большого количества клеток за меньший срок, эффективное использование среды и расходных материалов, возможность автоматизации. Флаконы G-Rex используются для получения TIL, ЕК и CAR-T клеток в клинических целях [7–9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизировать технологию экспансии ЕК-клеток с использованием флаконов, содержащих газопроницаемые мембраны, с последующим масштабированием для целей адоптивной иммунотерапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспансия ЕК-клеток

Исходным материалом для проведения экспансии служили образцы цельной периферической крови (ПК) доноров. Путем центрифугирования ПК на градиенте плотности $1,077 \text{ г/мл}$ при 400 g 30 минут получали мононуклеарные клетки (МНК). Далее МНК инкубировали в 3 вариантах экспансии в присутствии облученных в дозе 100 Гр фидерных клеток (ФК) в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10%



эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США), с добавлением ИЛ-2 (50 МЕ/мл; препарат ронколейкин, «НПК «БИОТЕХ», Россия) каждые 3–4 суток. ФК представляют собой производную линии K-562, полученную нами путем генетической модификации с целью эктопической экспрессии полноразмерного белка человека 4-1BBL и рекомбинантной мембраносвязанной формы ИЛ-21 человека (K-562-4-1BBL-мИЛ-21) [10].

Анализировали следующие варианты экспансии:

1. В 6-луночных планшетах G-Rex6M («Wilson Wolf Manufacturing», США) с площадью ростовой поверхности 10 см² в 100 мл среды. Стимуляция с ФК была однократной, соотношение МНК:ФК составило 1:5. Тестировали четыре посадочные (стартовые) плотности клеток (МНК + ФК): 0,5, 1,0, 1,2 и 1,5 × 10⁶/см². Длительность экспансии – 14 суток без пересева клеток и смены среды.
2. Во флаконах G-Rex100M («Wilson Wolf Manufacturing», США) с площадью ростовой поверхности 100 см² в 1000 мл среды. Стимуляция с ФК была однократной, соотношение МНК:ФК составило 1:5. Тестировали две посадочные плотности клеток (МНК + ФК): 1,2 и 1,5 × 10⁶/см². Длительность экспансии – 11–13 суток без пересева клеток и полной смены среды.
3. В стандартных флаконах типа T-75 и T-175 («Sarstedt», Германия) в 30 и 100 мл среды соответственно. Флаконы T-75 использовали в количестве 12 шт. в первую неделю экспансии для каждого клеточного продукта, T-175 – в количестве 8–36 шт. в последующие дни. Соотношение МНК:ФК составило 1:2 на начало культивирования и 1:1 – на 7-е сутки (рестимуляция). Стартовая концентрация клеток (МНК + ФК) – 0,75 × 10⁶/мл. Длительность экспансии – 14–19 суток с пересевом клеток и сменой среды каждые 3–4 суток.

На этапах экспансии оценивали количество клеток и их жизнеспособность в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего («Sigma-Aldrich», США) и светового микроскопа («Olympus», Япония).

Иммунофенотипический анализ

Методом проточной цитометрии определяли субпопуляционный состав исходного материала и клеточных продуктов. Для этого использовали моноклональные антитела к CD3 и CD56 («Beckman Coulter», США, «Exbio», Чехия). Запись проводили на приборах Cytomics FC500 и DxFLEX, полученные результаты анализировали в программах CXP Analysis и CytExpert («Beckman Coulter», США). Оценивали процентное содержание ЕК (CD3–CD56+) среди жизнеспособных клеток.

Измерение уровня метаболитов

Концентрацию глюкозы и лактата определяли в ростовой среде в процессе экспансии клеток в системах G-Rex с использованием расходных материалов к анализатору ABL800Flex («Radiometer Medical ApS», Дания).

Статистический анализ

Для сравнения показателей технологий экспансии результаты представлены в виде медианы, минимальных и максимальных значений. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 12. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение количества получаемых ЕК-клеток для целей адоптивной иммунотерапии требует перехода от экспансии клеток в стандартных Т-флаконах к другим системам культивирования. На основании описанных преимуществ в качестве новой системы нами были выбраны флаконы G-Rex и проведен подбор условий их использования для экспансии ЕК-клеток.

При применении флаконов G-Rex концентрацию культивируемых клеток представляют в виде плотности – количество клеток на 1 см² ростовой поверхности. Питательную среду добавляют в избытке на весь объем изделия из расчета 10 мл/см² для серии М, например, 1000 мл во флакон G-Rex100М с площадью поверхности 100 см² [6].

В предварительных экспериментах, проведенных с использованием 24-луночных планшетов G-Rex, нами были выбраны посадочные плотности клеток для последующих исследований по показателям жизнеспособности и максимально возможного прироста МНК (данные не представлены).

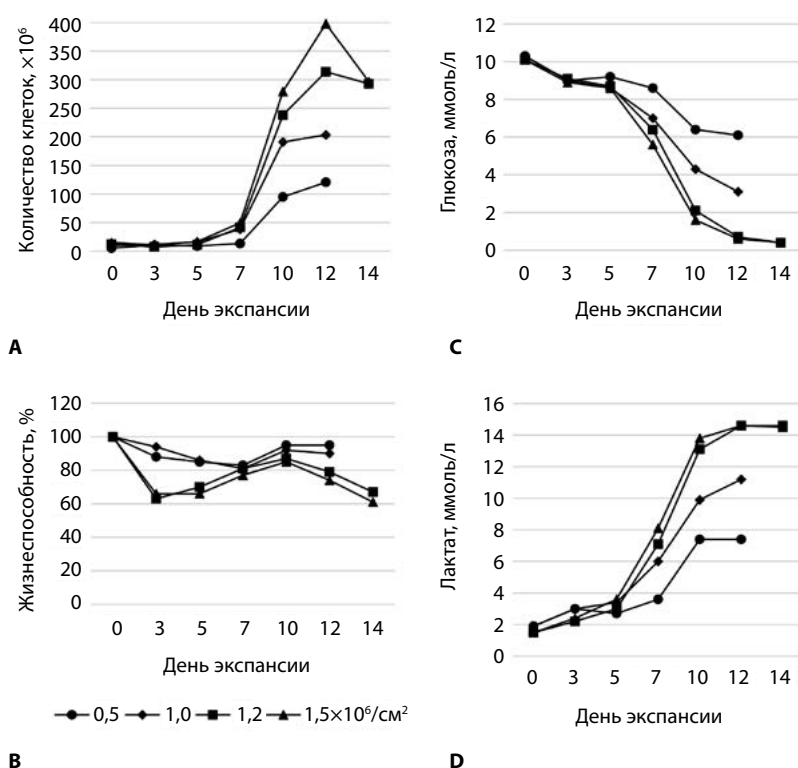


Рис. 1. Динамика изменения количества клеток (А), жизнеспособности (В) и концентрации метаболитов (С, D) в процессе экспансии в планшете G-Rex6M. 0,5, 1,0, 1,2 и 1,5 × 10⁶/см² – посадочные плотности клеток

Fig. 1. Dynamics of cell number (A), viability (B), and metabolites concentrations (C, D) during expansion in the G-Rex6M plate. 0.5, 1.0, 1.2 and 1.5 × 10⁶/cm² – seeding cell densities



Далее было изучено влияние посадочной плотности и продолжительности культивирования на прирост МНК и содержание ЕК-клеток, а также на динамику потребления глюкозы и образования лактата в процессе экспансии. Уровни указанных метаболитов могут быть использованы как суррогатные маркеры для мониторинга роста клеток в системах G-Rex [6, 9]. На рис. 1 представлены динамика изменения количества и жизнеспособности клеток, а также концентрации метаболитов во время культивирования в 6-луночных планшетах G-Rex.

Для всех используемых стартовых концентраций клеток ($0,5$, $1,0$, $1,2$ и $1,5 \times 10^6/\text{см}^2$) наблюдали медленный прирост МНК до 7 суток экспансии. До 5 суток культивирования также незначительно изменялись уровни глюкозы и лактата. После 7 суток были заметны различия в приросте количества клеток, более быстрое снижение уровня глюкозы и повышение уровня лактата при использовании высокой ($1,2 \times 10^6/\text{см}^2$ и $1,5 \times 10^6/\text{см}^2$) плотности посадки клеток по сравнению с низкой ($0,5 \times 10^6/\text{см}^2$ и $1,0 \times 10^6/\text{см}^2$) плотностью. На 12-е сутки при использовании высоких посадочных концентраций наблюдали максимальное количество экспансированных клеток, после чего их жизнеспособность продолжала снижаться, а уровни глюкозы и лактата практически не изменялись. В табл. 1 обобщены основные показатели экспансии клеток на 12-е сутки для всех исследуемых посадочных концентраций.

По совокупности полученных результатов (выход клеток, конечное содержание ЕК, жизнеспособность) для проведения масштабирования процесса экспансии на большие флаконы G-Rex100M была выбрана посадочная плотность клеток $1,2 \times 10^6/\text{см}^2$. В качестве условного критерия завершения процесса экспансии в нашей работе установлены значения концентрации глюкозы менее 2 ммоль/л и/или лактата более 12 ммоль/л . На рис. 2 представлены результаты для 2 доноров. При тестировании образца донора 1 целевой уровень лактата был достигнут на 9-е сутки культивирования. На 11-е сутки произвели подсчет клеток, прирост которых составил 127,7 раза, а плотность – $25,5 \times 10^6/\text{см}^2$. Однако при тестировании донора 2 в тех же условиях целевые значения метаболитов были достигнуты только на 13-е сутки. Прирост клеток составил 86,7 раза, плотность – $17,3 \times 10^6/\text{см}^2$. При детальном сравнении выявили различия в инициальном содержании ЕК-клеток и, следовательно, в их посадочной плотности. Так, в случае донора 1 начальное содержание ЕК-клеток было равно $25,3\%$, а посадочная плотность ЕК – $0,05 \times 10^6/\text{см}^2$. Для донора 2 данные показатели составили $7,4\%$ и $0,015 \times 10^6/\text{см}^2$ соответственно. На основании полученных данных нами было сделано предположение о том, что при низком содержании ЕК-клеток (менее 10%) необходимо увеличивать посадочную плотность клеток.

Таблица 1
Показатели экспансии в планшетах G-Rex6M на 12-е сутки культивирования
Table 1

Expansion rates in G-Rex6M plates on the 12th day of cultivation

Плотность клеток, $\times 10^6/\text{см}^2$		Прирост МНК, разы	ЕК-клетки, %	Глюкоза, ммоль/л	Лактат, ммоль/л
посадочная	конечная				
0,5	12,1	145	98,4	6,1	7,4
1,0	20,3	122	97,8	3,1	11,2
1,2	31,4	157	97,7	0,7	14,6
1,5	39,8	159	97,5	0,6	14,6

Проверили сделанное нами предположение на образце донора 3, для которого инициальное содержание ЕК-клеток составило также 7,4%, поэтому нами была увеличена посадочная плотность с $1,2$ до $1,5 \times 10^6/\text{см}^2$, соответственно, посадочная плотность ЕК-клеток составила $0,02 \times 10^6/\text{см}^2$. Для донора 3 в сравнении с донором 2 наблюдали увеличение скорости роста клеток, целевые значения метаболитов были достигнуты на 10-е сутки культивирования (рис. 2). Прирост клеток на 11-е сутки составил 86,4 раза, достигнута плотность $21,6 \times 10^6/\text{см}^2$. Процентное содержание ЕК-клеток в конечных продуктах было высоким для всех 3 тестируемых доноров и составило 96,9%, 95,8% и 90,3% соответственно, жизнеспособность была не ниже 82%.

Далее провели сравнение двух технологий экспансии ЕК-клеток для адоптивной иммунотерапии с использованием стандартных Т-флаконов и флаконов G-Rex. Расчет основных показателей проводили для конечных продуктов, полученных в 1 флаконе

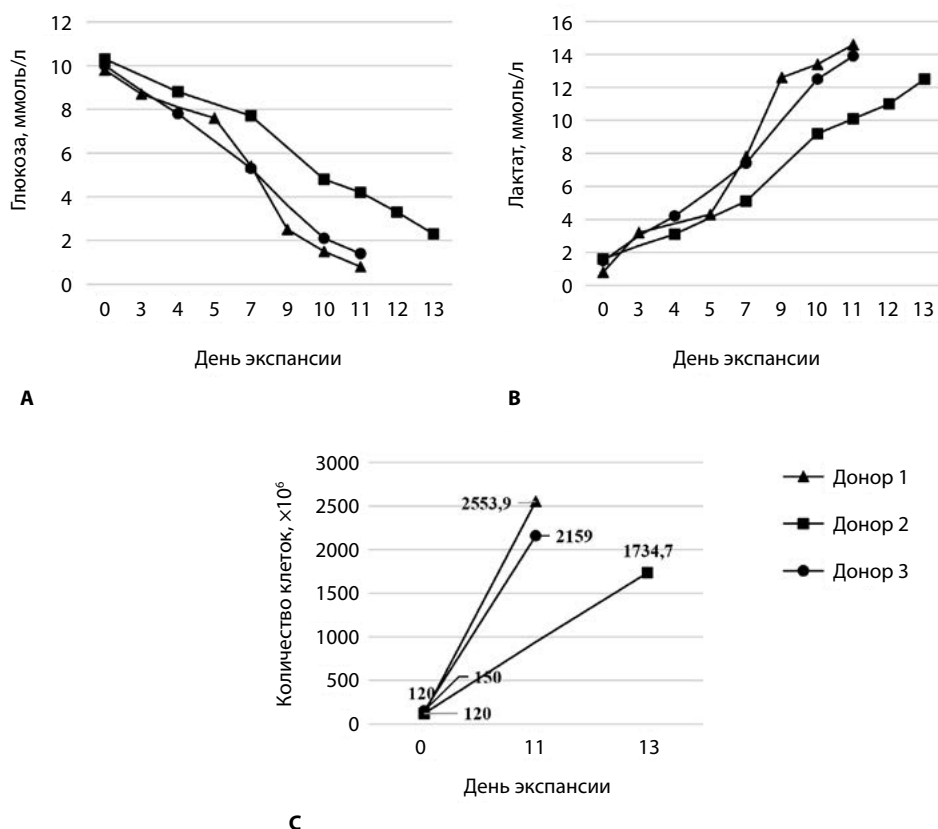


Рис. 2. Динамика изменения концентраций метаболитов (А, В) и прирост количества клеток (С) в процессе экспансии при использовании флаконов G-Rex100М и посадочной плотности клеток $1,2 \times 10^6/\text{см}^2$ для доноров 1 и 2 и $1,5 \times 10^6/\text{см}^2$ для донора 3
Fig. 2. Dynamics of metabolites concentrations (A, B) and cell count increase (C) during expansion in G-Rex100M flasks using seeding cell density $1.2 \times 10^6/\text{cm}^2$ for donors 1 and 2 and $1.5 \times 10^6/\text{cm}^2$ for donor 3



Таблица 2
Сравнение основных показателей результативности экспансии ЕК-клеток
Table 2
Comparison of the main indicators of NK cell expansion effectiveness

Показатели	G-Rex, n=6	T-флаконы, n=9	p
Исходный материал			
ЕК-клетки, %	9,3 (5,6–25,3)	12,6 (5,4–21,7)	0,5
ЕК-клетки, $\times 10^6$	2,3 (1,5–5,1)	11,3 (6,2–19,5)	0,002
Конечный продукт			
ЕК-клетки, %	95,3 (79,8–96,9)	96,1 (89–97,2)	0,7
ЕК-клетки, $\times 10^9$	1,55 (0,95–2,03)	1,56 (0,82–3,34)	0,4
Прирост ЕК-клеток, разы	551 (401–974)	130 (42–486)	0,004
Длительность экспансии, сутки	11 (11–13)	16 (14–19)	0,002
Стоимость, бел. руб.*	1104 (1099–1209)	1024 (554–1713)	0,3

Примечание: * ориентировочная стоимость процесса экспансии в ценах 2021 года без учета стоимости процессинга первичного материала и конечного клеточного продукта.

G-Rex100M и из 12 стартовых флаконов T-75 (табл. 2). Из таблицы видно, что прирост ЕК-клеток достоверно выше при культивировании во флаконах с газопроницаемой мембраной G-Rex, чем при культивировании в Т-флаконах, что позволило использовать меньшее количество исходного материала и сократить срок экспансии для получения сравнимых по содержанию ЕК-клеток конечных продуктов.

В отличие от использования флаконов G-Rex, где основными этапами технологических процедур фактически являются выделение, посев и сбор клеток, применение Т-флаконов дополнительно к этим этапам включает в себя рестимуляцию с ФК и пересев клеток два и более раза в зависимости от продолжительности культивирования. Подсчитанные затраты времени на манипуляции для экспансии ЕК-клеток для флакона G-Rex составили в среднем 7,5 часа, для Т-флаконов – 12 часов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы нами были оптимизированы условия для проведения экспансии ЕК-клеток во флаконах с газопроницаемой мембраной G-Rex100M для клинических целей: определены посадочные плотности клеток, установлены критерии для завершения процесса экспансии, получен клеточный продукт, сопоставимый по абсолютному и относительному содержанию целевых клеток с продуктом, экспансированным в стандартных Т-флаконах.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Liu S., Galat V., Galat Y. (2021) NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*, vol. 14, no 1, article 7. doi: 10.1186/s13045-020-01014-w
2. Lee D.A. (2019) Cellular therapy: adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev*, vol. 290, iss. 1, pp. 85–99. doi: 10.1111/imr.12793
3. Vela M., Corral D., Carrasco P. (2018) Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Lett*, vol. 422, pp. 107–117. doi: 10.1016/j.canlet.2018.02.033
4. Silla L., Valim V., Pezzi A. (2021) Adoptive immunotherapy with double-bright (CD56bright / CD16bright) expanded natural killer cells in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a proof-of-concept study. *Br J Haematol*, vol. 195, no 5, pp. 710–721. doi: 10.1111/bjh.17751
5. Granzin M., Wagner J., Köhl U. (2017) Shaping of natural killer cell antitumor activity by ex vivo cultivation. *Front Immunol*, vol. 8, article 458. doi: 10.3389/fimmu.2017.00458
6. Bajgain P., Mucharla R., Wilson J. (2014) Optimizing the production of suspension cells using the G-Rex "M" series. *Mol Ther Methods Clin Dev*, vol. 1, article 14015. doi: 10.1038/mtm.2014.15
7. Jin J., Sabatino M., Somerville R. (2012) Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. *J Immunother*, vol. 35, iss. 3, pp. 283–292. doi: 10.1097/CJI.0b013e31824e801f
8. Lapteva N., Durett A.G., Sun J. (2012) Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*, vol. 14, iss. 9, pp. 1131–1143. doi: 10.3109/14653249.2012.700767
9. Gagliardi C., Khalil M., Foster A.E. (2019) Streamlined production of genetically modified T cells with activation, transduction and expansion in closed-system G-Rex bioreactors. *Cytotherapy*, vol. 21, iss. 12, pp. 1246–1257. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.10.006
10. Vashkevich E.P., Migas A.A., Meleshko A.N. (2020) Expansion and activation of human natural killer cells ex vivo in the presence of transgenic feeder cells. *Cell and Tissue Biology*, vol. 14, no 5, pp. 365–371. doi: 10.1134/S1990519X20050090