

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038848**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.28

(21) Номер заявки
201890121

(22) Дата подачи заявки
2016.06.24

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) СПОСОБ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК-КИЛЛЕРОВ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК-КИЛЛЕРОВ

(31) 10-2015-0089882; 10-2016-0078622

(32) 2015.06.24; 2016.06.23

(33) KR

(43) 2018.06.29

(86) PCT/KR2016/006754

(87) WO 2016/209021 2016.12.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЧА БИОТЕК КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Бэк Ён Сок (KR)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)**

(56) KR-A-1020100012586
KR-A-1020120090485

DE MARIA, Andrea et al., "Revisiting Human Natural Killer Cell Subset Function Revealed Cytolytic CD56dimCD16+ NK Cells as Rapid Producers of Abundant IFN-gamma on Activation", PNAS, 2011, vol. 108, no. 2, pages 728-732 See abstract; results section.

ANDRE, Pascale et al., "Comparative Analysis of Human NK Cell Activation Induced by NKG2D and Natural Cytotoxicity Receptors", European Journal of Immunology, 2004, vol. 34, no. 4, pages 961-971 See the entire document.

JP-A-2010220479
KR-A-1020140123503

(57) Настоящее изобретение относится к способу пролиферации естественных клеток-киллеров и композиции для пролиферации естественных клеток-киллеров, способных улучшать эффект пролиферации клеток и их противораковое действие, где способ включает в себя стадию культивирования естественных клеток-киллеров в культуральной жидкости, содержащей первый интерлейкин (IL-2), второй интерлейкин (по меньшей мере один интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-12, IL-15 и IL-18) и антитело к NKp46.

B1

038848

038848

B1

Область техники

Настоящее раскрытие относится к способу пролиферации естественных клеток-киллеров, композиции для пролиферации естественных клеток-киллеров и повышенному противораковому действию пролиферированных естественных клеток-киллеров.

Предпосылки создания изобретения

Естественные клетки-киллеры (здесь и далее "NK-клетки"), используемые в клеточной иммунотерапии - это клетки, которые морфологически характеризуются крупными цитоплазматическими гранулами и которые составляют примерно от 5 до 15% от содержания лимфоцитов в крови. Основные функции NK-клеток, идентифицированные к настоящему времени, включают способность убивать опухолевые клетки, цитотоксичность против инфицированных вирусами клеток, способность убивать бактерии и грибы и т.д. Поэтому ожидается, что NK-клетки будут играть важную роль в противоопухолевом иммунитете и защитном иммунитете против микроорганизмов.

NK-клетки выделяются в отдельный класс иммунных клеток, отличающийся от Т-клеток или В-клеток, потому что у них нет рецепторов на клеточной поверхности, таких как Т-клеточный рецептор, CD4 или иммуноглобулин. В частности, известно, что NK-клетки способны неспецифически убивать опухоли. Эта способность NK-клеток используется в лечении солидных опухолей вместе с лимфокинактированными клетками-киллерами (LAK) и инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL) или для иммунотерапии путем вливания донорских лимфоцитов (Tilden. A.B. et al., J. Immunol., 136), которая применяется в качестве современной клеточной терапии для предотвращения отторжения при пересадке костного мозга или пересадке органов. Сообщалось также, что нарушение дифференцировки или активности NK-клеток связано с различными раковыми заболеваниями, в том числе раком молочной железы (Konjevic G, et al., Breast Cancer Res. Treat., 66: 255-263, 2001), меланомой (Ryuke Y, et al., Melanoma Res., 13: 349-356, 2003), раком легкого (Villegas F R, et al., Lung Cancer, 35: 23-28, 2002) и т.д., и поэтому NK-клеточная терапия появилась в области лечения этих заболеваний.

Для эффективного применения NK-клеток в клеточной иммунотерапии, такой как лечение онкологических заболеваний, требуется большое число NK-клеток. Однако NK-клетки составляют только от 5 до 15% от содержания лимфоцитов в крови у здорового человека, как описано выше. В частности, число, дифференциация и функционирование NK-клеток часто снижены у онкологических пациентов, и обеспечить достаточное для лечения заболеваний количество NK-клеток действительно трудно. Кроме того, NK-клетки, созданные существующими способами пролиферации NK-клеток, отличаются друг от друга скоростью пролиферации и цитотоксичностью. Следовательно, срочно требуется новый способ пролиферации или дифференциации NK-клеток, который позволил бы обеспечивать большое количество NK-клеток, сохраняющих способность убивать раковые клетки на достаточном уровне.

Подробное описание изобретения

Техническая проблема

Задачей настоящего раскрытия является предложить способ пролиферации естественных клеток-киллеров с улучшенным противоопухолевым действием.

Другой задачей настоящего раскрытия является предложить способ получения естественных клеток-киллеров.

Еще одной задачей настоящего раскрытия является предложить фармацевтическую композицию для лечения или предотвращения онкологического заболевания, включающую естественные клетки-киллеры.

И еще одной задачей настоящего раскрытия является предложить композицию для пролиферации естественных клеток-киллеров.

Техническое решение

В одном аспекте предложен способ пролиферации естественных клеток-киллеров (NK-клеток), причем способ включает культивирование NK-клеток в культуральной среде, содержащей первый интерлейкин, второй интерлейкин и антитело к NKp46.

Первый интерлейкин может представлять собой IL-2.

Второй интерлейкин может представлять собой один или несколько интерлейкинов из группы, состоящей из интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15) и интерлейкина-18 (IL-18). Предпочтительно, чтобы второй интерлейкин представлял бы собой IL-12, IL-18, IL-12/IL-18 или IL-12/IL-15/IL-18, и более предпочтительно IL-18.

Культивирование NK-клеток может быть культивированием клеток в культуральной среде, содержащей первый интерлейкин, второй интерлейкин и антитело к NKp46, в присутствии гамма-глобулина (IgG) и фибронектина. Способ настоящего раскрытия может дополнительно улучшить противораковое действие NK-клеток путем культивирования NK-клеток в присутствии гамма-глобулина (IgG) и фибронектина.

В данном контексте термин "клеточная пролиферация" или "пролиферация клеток" означает то, что число клеток растет в культуральной среде в ходе последовательного деления клеток или дифференциации клеток. В данном контексте термин "пролиферация NK-клеток" означает то, что число NK-клеток растет в культуральной среде в ходе последовательного деления клеток или число NK-клеток растет

вследствие дифференциации незрелых клеток крови в NK-клетки. Поэтому "пролиферация NK-клеток" может включать увеличение числа NK-клеток, дифференциацию недифференцированных лимфоцитов в NK-клетки путем приобретения признаков NK-клеток или созревание NK-клеток из незрелых NK-клеток.

NK-клетку, которая является исходным материалом для пролиферации, можно приобрести в продаже или взять у человека или животного, предпочтительно у человека, который нуждается в терапии NK-клетками. Кроме того, NK-клетку можно выделить из любого тканевого источника в организме. Например, NK-клетки могут быть в крови, взятой из организма. При условии, что кровь содержит NK-клетки, она может использоваться в качестве источника NK-клеток для осуществления способа пролиферации NK-клеток, например, это может быть цельная кровь, кровь пуповины, костный мозг или периферическая кровь.

Пролиферация NK-клеток может включать, например, культивирование одноядерных клеток периферической крови. Термин "одноядерные клетки периферической крови (PBMC)" означает одноядерные клетки, выделенные из периферической крови млекопитающего, предпочтительно человека, и включает иммунные клетки, такие как B-клетки, T-клетки и NK-клетки, и гранулоциты, такие как базофилы, эозинофилы и нейтрофилы. PBMC можно получать из периферической крови, взятой из живого организма в соответствии с общим методом получения. Предпочтительно можно выделять PBMC из периферической крови с помощью центрифугирования по удельному весу с использованием Ficoll.

PBMC можно получать от субъекта, нуждающегося в лечении, а именно это может быть аутологичная одноядерная клетка периферической крови. Если PBMC представляет собой аутологичную одноядерную клетку периферической крови, то это предпочтительно, поскольку в этом случае не требуется удалять T-клетки, т.к. все клетки взяты от самого пациента, хотя некоторые T-клетки присутствуют в пролиферированных популяциях NK-клеток.

PBMC, используемые в способе пролиферации NK-клеток настоящего изобретения, можно подвергать криоконсервации. В конкретном варианте осуществления после выделения PBMC из крови их можно замораживать. Затем PBMC можно размораживать и использовать для пролиферации NK-клеток. Замораживание можно выполнять способом, известным в уровне техники, предпочтительно способом, включающим первое замораживание в интервале температур от 4°C до -42°C, второе замораживание в интервале температур от -42°C до -15°C и третье замораживание в интервале температур от -15°C до -120°C. В этом случае температуру при каждом замораживании можно повышать или понижать до верхнего предела или нижнего предела температурного интервала каждого замораживания путем выдерживания образца в течение заранее определенного времени последовательно при перемежающихся температурах в пределах температурного интервала. В конкретном варианте осуществления первое замораживание можно выполнять при 0°C в течение 10-15 мин, при -12°C в течение 5-10 мин, при -42°C в течение 0,5-1 мин. После первого замораживания второе замораживание можно выполнять при -25°C в течение 1-3 мин и при -15°C в течение 1-3 мин, и после второго замораживания третье замораживание можно выполнять при -42°C в течение 20-40 мин и при -120°C в течение 20-50 мин. В другом варианте осуществления первое замораживание можно выполнять в интервале температур от 4 до -40°C со скоростью от 0,5 до 5°C/мин, второе замораживание можно выполнять в интервале температур от -40 до -90°C со скоростью от 1 до 10°C/мин после первого замораживания, и третье замораживание можно выполнять в интервале температур от -90 до -120°C со скоростью от 1 до 10°C/мин после второго замораживания. Каждое замораживание способа замораживания может выполняться с помощью программируемого криозамораживателя (CRF -controlled rate freezer). При заморозке PBMC настоящего изобретения PBMC предпочтительно замораживают после приведения количества выделенных клеток к требуемому значению путем флотации клеток в смеси CryoStor CS10 или Aly505NK-EX и альбумин+DMSO. После разморозки клеток замороженные PBMC можно использовать для культивирования и пролиферации NK-клеток в соответствии с настоящим изобретением, и способ замораживания обладает теми преимуществами, что NK-клетки пригодны для использования путем процессов культивирования и пролиферации в любое время, когда NK-клетки потребуются после взятия крови у пациента. Неудобство большинства клеточных иммунотерапий состоит в том, что каждые две недели необходимо брать кровь у пациента с учетом периода культивирования при установленном 2-недельном периоде инкубации, чтобы получить клинически эффективное количество клеток, а на клеточную культуру может влиять состояние пациента. Однако данное изобретение может предложить способ замораживания и размораживания PBMC, который может позволить поддерживать высокую выживаемость и может успешно применяться в способе культивирования активированных NK-клеток. Таким образом, оно позволяет осуществлять регулярное получение NK-клеток и введение их пациенту вне зависимости от состояния пациента, поскольку большой объем крови пациента может быть взят, отделен и заморожен/сохранен, когда состояние у пациента хорошее.

Способ пролиферации NK-клеток согласно одному варианту осуществления может включать культивирование NK-клеток в присутствии гамма-глобулина (IgG) и фибронектина. Культивирование в присутствии гамма-глобулина (IgG) и фибронектина может быть, например, культивированием клеток в культуральной среде, содержащей гамма-глобулин и фибронектин, или культивированием клеток в культуральном планшете, в котором культуральная поверхность (поверхность культурального планшета, на-

ходящаяся в контакте с клетками) покрыта гамма-глобулином (IgG) и фибронектином. Предпочтительно, чтобы культивирование НК-клеток могло проводиться в культуральном планшете с покрытием из гамма-глобулина и фибронектина. Культуральный планшет с покрытием из гамма-глобулина и фибронектина можно готовить, нанося на планшет раствор, содержащий гамма-глобулин и фибронектин. Вместо фибронектина - известного адгезивного белка - можно использовать, например, коллаген. В одном примере покрытие из гамма-глобулина и фибронектина на культуральный планшет можно наносить путем введения раствора, содержащего гамма-глобулин и фибронектин, в культуральный планшет (например, колбу T75) и инкубирования культурального планшета при низкой температуре.

Концентрация гамма-глобулина может составлять от 0,1 до 1 нг/мл, от 1 до 10 нг/мл, от 10 до 100 нг/мл или от 1 до 100 нг/мл. Гамма-глобулин может активировать НК-клетки путем стимулирования FcγRIII рецептора НК-клеток.

Концентрация фибронектина может составлять от 0,1 до 50 мкг/мл, от 1 до 50 мкг/мл, от 5 до 50 мкг/мл или от 10 до 50 мкг/мл. Фибронектин может облегчать взаимодействие между клетками, способствуя движению НК-клеток.

Способ пролиферации НК-клеток согласно одному варианту осуществления может проводиться культивированием НК-клеток в культуральной среде, содержащей первый интерлейкин (IL-2), второй интерлейкин (один или несколько интерлейкинов, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-15 и IL-18) и антитело к НКр46. Культуральная среда может представлять собой среду, полученную введением антитела к НКр46, второго интерлейкина и IL-2 в обычную среду для иммунных клеток. Среда для иммунных клеток может включать, например, ALyS505NK-EX (Cell Science & Technology Inst. Inc., Япония), RPMI1640 (Life technologies, США), x-vivo10 (Lonza, США), CellGro SCGM (CellGenix, Германия), KBM (Kohjin bio, Япония) и т.д. Культуральную среду согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения можно приготовить, вводя антитело к НКр46, второй интерлейкин и IL-2 в описанную выше среду для иммунных клеток. Культуральную среду согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения можно также приготовить, вводя антитело к НКр46 и второй интерлейкин в поступающую в продажу среду для иммунных клеток, которая уже содержит IL-2.

Культуральная среда может без ограничения быть любой культуральной средой для иммунных клеток при условии, что эта среда для иммунных клеток содержит второй интерлейкин, антитело к НКр46 и IL-2.

Концентрация IL-2 в культуральной среде может быть от 500 до 5000 МЕ/мл, от 600 до 4000 МЕ/мл, от 700 до 3000 МЕ/мл, от 800 до 2000 МЕ/мл, от 900 до 1500 МЕ/мл, от 900 до 1200 МЕ/мл, или от 1000 до 1200 МЕ/мл. IL-2 может облегчать рост НК-клеток.

Концентрация антитела к НКр46 в культуральной среде может быть от 0,1 до 10 мкг/мл, от 0,5 до 10 мкг/мл, от 1 до 10 мкг/мл или от 5 до 10 мкг/мл. НКр46 является активирующим рецептором НК-клеток, и, таким образом, антитело к НКр46 по настоящему изобретению может активировать НК-клетки путем стимулирования НКр46.

Концентрация второго интерлейкина в культуральной среде может быть от 0,1 до 100 нг/мл, от 1 до 100 нг/мл, от 10 до 100 нг/мл, от 20 до 100 нг/мл, от 30 до 100 нг/мл, от 50 до 100 нг/мл или от 70 до 100 нг/мл. Второй интерлейкин настоящего изобретения представляет собой компонент, который способен увеличивать эффективность пролиферации НК-клеток и в значительной степени улучшать активацию НК-клеток. Поэтому использование в соответствии с настоящим изобретением второго интерлейкина дополнительно к IL-2 и антителу к НКр46, может продемонстрировать усиливающее и синергическое воздействие на НК-клеточную пролиферацию и активацию со стороны IL-2 и антител к НКр46, и, соответственно, настоящее изобретение может предложить усовершенствованное воздействие на НК-клеточную пролиферацию по сравнению с известным способом пролиферации НК-клеток.

В результате этого комбинация IL-2, второго интерлейкина и антитела к НКр46, которые являются компонентами, входящими в композицию для пролиферации НК-клеток настоящего изобретения, может максимизировать пролиферацию и эффективность культивирования НК-клеток, и настоящее изобретение является очень экономичным вследствие использования комбинации только основных компонентов.

Культуральная среда может дополнительно включать плазму или сыворотку. Плазму или сыворотку, включенную в культуральную среду, можно получить из периферической крови, из которой были выделены РВМС, использованные для пролиферации НК-клеток. Концентрация плазмы может быть от 1 до 20 об./об.%, от 1 до 15 об./об.%, от 2 до 15 об./об.%, от 5 до 15 об./об.% или от 5 до 10 об./об.% по отношению к общему объему культуральной среды.

В конкретном варианте осуществления РВМС и плазму (или сыворотку) можно выделять из периферической крови пациента, которому будут вводить НК-клетки, соответственно, и полученные РВМС можно культивировать в культуральной среде, содержащей IL-2, второй интерлейкин, антитело к НКр46 и плазму (или сыворотку), выделенную из периферической крови. Предпочтительно проводить культивирование в культуральном планшете с покрытием из гамма-глобулина и фибронектина.

Культивирование РВМС можно проводить в обычных условиях для культивирования клеток, т.е. в CO₂ инкубаторе при 37°C, и оно может продолжаться с добавлением культуральной среды каждые 2 или 3 дня. Концентрация РВМС, вводимых в культуральную среду, может составлять от 4×10⁵ до 5×10⁷ клеток/мл, но не

ограничивается этими условиями. Период культивирования может продолжаться, например, от 7 до 20 дней, от 8 до 18 дней, от 10 до 16 дней, от 10 до 15 дней или от 10 до 14 дней, но не ограничивается этим. Для обеспечения требуемого количества НК-клеток период культивирования можно определять соответственно в пределах вышеуказанного интервала или вне пределов вышеуказанного интервала. Культуральный планшет может представлять собой чашку, колбу, планшет, многолуночный планшет и культуральный мешок, которые находятся в продаже.

Между тем, с целью максимального выхода пролиферации НК-клеток, культивирование можно проводить постадийно. В этом случае компоненты культуральной среды, культуральный планшет и период культивирования на каждой стадии могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Путем нахождения оптимального периода культивирования для каждой стадии можно в конце концов достичь пролиферации НК-клеток. Кроме того, настоящее изобретение отличается тем, что культивирование производят путем введения композиции для культивирования (или культуральной среды) в колбу с интервалом в 2-3 дня в ходе периода культивирования, тем самым поддерживая культуру НК-клеток.

В одном варианте осуществления способ пролиферации НК-клеток настоящего изобретения может включать первое культивирование культивирования РВМС путем введения РВМС и культуральной среды, включающей первый интерлейкин, второй интерлейкин, антитело к НКр46 и плазму в культуральный планшет с покрытием из гамма-глобулина и фибронектина; и второе культивирование культивирования культуры, полученной при первом культивировании, путем дальнейшего введения туда культуральной среды, включающей первый интерлейкин, второй интерлейкин, антитело к НКр46 и плазму. В способе пролиферации первый интерлейкин может представлять собой интерлейкин-2 (IL-2). Далее второй интерлейкин может представлять собой один или несколько интерлейкинов из группы, состоящей из интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15) и интерлейкина-18 (IL-18). Первый интерлейкин и второй интерлейкин такие же, как описано выше.

Плазму можно получать из периферической крови, из которой были получены РВМС. Вместо плазмы можно использовать сыворотку.

Концентрация IL-2 в культуральной среде при первом культивировании может быть от 500 до 5000 МЕ/мл, от 600 до 4000 МЕ/мл, от 700 до 3000 МЕ/мл, от 800 до 2000 МЕ/мл, от 900 до 1500 МЕ/мл, от 900 до 1200 МЕ/мл или от 1000 до 1200 МЕ/мл.

При первом культивировании РВМС можно культивировать в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней, например в течение 3, 4, 5, 6 дней, предпочтительно 5 дней, в культуральной среде, содержащей первый интерлейкин (IL-2), второй интерлейкин (один или несколько интерлейкинов, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-15 и IL-18), антитело к НКр46 и плазму.

Способ пролиферации НК-клеток согласно настоящему изобретению может включать последующее введение культуральной среды, включающей IL-2 и плазму, в культуру в ходе первого культивирования. Например, культуральную среду, включающую IL-2 и плазму, предназначенную для последующего введения, можно вводить на 3-й день и/или 4-й день после первого культивирования. Концентрация IL-2 в культуральной среде, предназначенной для последующего введения, может быть такой же, как и в культуральной среде при первом культивировании, но не ограничивается этим. Объем культуральной среды, предназначенной для последующего введения, может быть равен объему культуры.

В конкретном варианте осуществления способ пролиферации НК-клеток настоящего изобретения включает второе культивирование культивирования культуры, полученной при первом культивировании, путем дополнительного введения туда культуральной среды, содержащей первый интерлейкин (IL-2), второй интерлейкин (один или несколько интерлейкинов, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-15 и IL-18), антитело к НКр46 и плазму.

Второе культивирование можно выполнять путем переноса культуры, полученной при первом культивировании, в новый планшет. Новый планшет может не включать гамма-глобулин и фибронектин. Концентрация IL-2 в культуральной среде при втором культивировании может быть такой же, как и в культуральной среде при первом культивировании, но не ограничивается этим. Концентрация IL-2 в культуральной среде при втором культивировании может быть от 500 до 5000 МЕ/мл, от 600 до 4000 МЕ/мл, от 700 до 3000 МЕ/мл, от 800 до 2000 МЕ/мл, от 900 до 1500 МЕ/мл, от 900 до 1200 МЕ/мл или от 1000 до 1200 МЕ/мл. Объем культуральной среды, содержащей первый интерлейкин, второй интерлейкин (один или несколько, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-15 и IL-18), антитело к НКр46 и плазму, который вводят в культуру при втором культивировании, может быть равен объему культуры.

Клетки могут быть культивированы в культуральной среде при втором культивировании в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней, предпочтительно в течение 1, 2 или 3 дней.

Способ пролиферации НК-клеток настоящего изобретения может дополнительно включать третье культивирование культивирования после снижения концентрации IL-2 в культуре до 4/5 или ниже - до 1/10 или ниже относительно концентрации до введения культуры. Концентрация IL-2 может составлять, например, от 1/100 до 3/5, от 1/100 до 1/4, от 1/100 до 2/5, от 1/100 до 1/3 или от 1/100 до 1/5 относительно концентрации до введения культуры.

Концентрацию IL-2 в культуральной среде можно снижать путем введения в культуру культуральной среды без IL-2. Культуральная среда, вводимая при третьем культивировании, может содержать плазму.

Концентрация IL-2 в культуре при третьем культивировании может быть от 1500 до 1300 МЕ/мл, от 1300 до 1000 МЕ/мл, от 1000 до 600 МЕ/мл, от 600 до 500 МЕ/мл, от 500 до 400 МЕ/мл, от 400 до 300 МЕ/мл, от 300 до 200 МЕ/мл или от 200 до 100 МЕ/мл.

Культуральная среда при каждом культивировании может содержать подходящие белки, цитокины, антитела, соединения и другие компоненты, при условии, что они не препятствуют пролиферативному эффекту NK-клеток.

В конкретном варианте осуществления пролиферированные клетки могут экспрессировать одно или несколько выбранных из группы, состоящей из CD56, CD16, NKG2D, перфорина и гранзима В. Например, экспрессия может представлять собой экспрессию большого количества вышеуказанных факторов по сравнению с клетками периферической крови или их популяциями до пролиферации или NK-клеток или их популяций до пролиферации. Например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% клеток периферической крови или их популяций, включая пролиферированные NK-клетки, или пролиферированных NK-клеток или их популяций от всего количества клеток или клеточных популяций могут экспрессировать вышеупомянутые факторы. И "% экспрессии" или "уровень экспрессии" означает процент NK-клеток, экспрессирующих один или несколько из вышеупомянутых факторов, относительно общего числа клеток в образце. Экспрессия или уровень экспрессии фактора в клетках или клеточных популяциях может определяться по значению, выявленному с помощью проточной цитометрии.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения, дополнительно включающий консервирование NK-клеток, пролиферированных способом пролиферации NK-клеток, после суспендирования NK-клеток в растворе, содержащем декстран и альбумин.

В одном примере было найдено, что NK-клетки, пролиферированные способом пролиферации NK-клеток настоящего изобретения, экспрессировали противоопухолевые вещества с высоким выходом и продемонстрировали замечательное противораковое действие по сравнению с РВМС (см. фиг. 7-9).

В еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения онкологического заболевания, включающая пролиферированные NK-клетки.

NK-клетки, включенные в фармацевтическую композицию, и способ пролиферации NK-клеток такие же, как и описано выше.

Субъектом может быть млекопитающее, включая человека.

Онкологическое заболевание может представлять собой лейкемию, рак молочной железы, рак яичника, рак мозга, злокачественную меланому, рак желудка, рак печени, колоректальный рак или рак легкого, но не ограничивается этим перечнем.

Фармацевтическая композиция может включать клеточные популяции NK-клеток, культивированных способом пролиферации NK-клеток. Композиция может включать культуральную среду, использованную при культивировании, или культуру дополнительно к клеточным популяциям, культивированным этим способом. Композиция может включать новую культуральную среду или физиологический раствор, не содержащие клеточные популяции, выделенные из культуры, и дополнительные компоненты, такие как цитокины. Новая культуральная среда может представлять собой среду, состав которой идентичен составу среды, использованной для культивирования NK-клеток, или отличается от него. В фармацевтической композиции вводимая доза NK-клеток может изменяться в зависимости от состояния и веса тела пациента, тяжести заболевания, режима введения, пути и продолжительности введения, и например, вводимая доза может быть от 1×10^6 до 1×10^9 клеток/кг, предпочтительно от 1×10^7 до 1×10^9 клеток/кг. Введение можно осуществлять один или несколько раз в день. При составлении фармацевтической композиции в виде жидкого состава композиции стандартной дозы, такого как раствор, суспензия, эмульсия и т.д., ее можно вводить пациенту при вышеуказанных клеточных концентрациях.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может включать NK-клетки, пролиферированные способом настоящего раскрытия, как описано выше, и может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическую композицию можно готовить в соответствии с обычным способом в виде парентерального препарата, такого как раствор, суспензия, эмульсия, лиофилизированный препарат и т.д. Фармацевтически приемлемый носитель может включать водный разбавитель, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, очищенная вода, стерильная вода и т.д., или растворитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать другие обычные консерванты и т.д. Фармацевтическая композиция может включать в себя различные противораковые средства или другие терапевтические средства в дополнение к NK-клеткам или популяциям NK-клеток.

Еще в одном аспекте предложен способ лечения или предотвращения онкологического заболевания, включающий введение субъекту пролиферированных NK-клеток.

Субъект и онкологическое заболевание такие же, как описано выше.

При введении пролиферированных NK-клеток путь введения может быть пероральным или парентеральным путем (например, инъекцией), и инъекция может представлять собой внутривенную инъекцию, подкожную инъекцию, внутримышечную инъекцию или внутрибрюшинную инъекцию, но особен-

но не ограничивается этим перечнем.

Еще в одном аспекте предложено применение пролиферированных НК-клеток в получении терапевтического или профилактического средства против онкологического заболевания.

Еще в одном аспекте предложена композиция для пролиферации НК-клеток, включающая первый интерлейкин (IL-2), второй интерлейкин (один или несколько интерлейкинов, выбранных из группы, состоящей из интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15) и интерлейкина-18 (IL-18)) и антитело к НКр46.

Еще в одном аспекте предложено применение композиции, включающей первый интерлейкин (IL-2), второй интерлейкин (один или несколько интерлейкинов, выбранных из группы, состоящей из интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15) и интерлейкина-18 (IL-18)) и антитело к НКр46, в получении композиции для пролиферации НК-клеток.

Композиция для пролиферации НК-клеток может дополнительно включать гамма-глобулин и фибронектин. В композиции первый интерлейкин и второй интерлейкин такие же, как описано выше.

Концентрация IL-2 в композиции для пролиферации НК-клеток может быть от 500 до 5000 МЕ/мл, от 600 до 4000 МЕ/мл, от 700 до 3000 МЕ/мл, от 800 до 2000 МЕ/мл, от 900 до 1500 МЕ/мл, от 900 до 1200 МЕ/мл или от 1000 до 1200 МЕ/мл.

Концентрация второго интерлейкина в композиции для пролиферации НК-клеток может быть от 0,1 до 100 нг/мл, от 1 до 100 нг/мл, от 10 до 100 нг/мл, от 20 до 100 нг/мл, от 30 до 100 нг/мл, от 50 до 100 нг/мл или от 70 до 100 нг/мл.

Концентрация антитела к НКр46 в композиции для пролиферации НК-клеток может быть от 0,1 до 10 мкг/мл, от 0,5 до 10 мкг/мл, от 1 до 10 мкг/мл или от 5 до 10 мкг/мл.

Композиция для пролиферации НК-клеток может предназначаться для пролиферации или дифференциации НК-клеток из РВМС.

Композиция для пролиферации НК-клеток может дополнительно включать плазму или сыворотку. Плазму или сыворотку, вводимые в композицию, можно получать из крови, из которой были выделены НК-клетки. В конкретном варианте осуществления плазму, входящую в состав композиции для пролиферации НК-клеток, можно получать из периферической крови, из которой выделены РВМС.

В состав композиции для пролиферации НК-клеток могут входить основные составляющие для культивирования РВМС и пролиферации НК-клеток, другие носители или вспомогательные вещества, в дополнение к гамма-глобулину, фибронектину, первому интерлейкину (IL-2), второму интерлейкину (один или несколько, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-15 и IL-18) и антителу к НКр46.

Полезный эффект от изобретения

Способ пролиферации естественных клеток-киллеров (НК) или композиция для пролиферации НК-клеток согласно одному аспекту может способствовать пролиферации и дифференциации НК-клеток и может стабильно обеспечивать НК-клетки с повышенной цитотоксичностью. Применение полученных этим способом НК-клеток может быть полезно в лечении заболеваний, таком как лечение онкологических заболеваний.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показаны результаты в виде общего числа клеток (А) и кратно увеличение числа НК (естественных киллеров) клеток (В) с помощью способа пролиферации согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 2 показаны результаты в виде общего числа клеток (А) и процента НК-клеток (В), полученных с помощью способов пролиферации согласно различным конкретным вариантам осуществления.

На фиг. 3 показаны результаты характера НК-клеточной пролиферации в зависимости от концентраций IL-2.

На фиг. 4 показаны результаты активности НК в зависимости от концентраций IL-12 и IL-18.

На фиг. 5 показаны результаты проточной цитометрии НК-клеток, полученных с помощью способа пролиферации согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 6 показаны результаты проточной цитометрии активации рецепторов НК-клеток, полученных согласно конкретному варианту осуществления.

На фиг. 7 показаны результаты проточной цитометрии при исследовании экспрессии противораковых веществ в НК-клетках, полученных согласно конкретному варианту осуществления.

На фиг. 8 показаны результаты проточной цитометрии при исследовании % лизиса раковых клеток клеточной линии лейкемии - K562 - НК-клетками, полученными согласно различным конкретным вариантам осуществления.

На фиг. 9 показаны результаты проточной цитометрии при исследовании % лизиса раковых клеток K562 (хронический лейкоз), OVCAR3 (рак яичника), Hep3B (рак печени), HepG2 (рак печени), A704 (рак почки) и DU145 (рак простаты) НК-клетками, полученными согласно конкретному варианту осуществления.

На фиг. 10 приведены характеристики РВМС Донора 1 до культивации, где А представляет собой процент НК-клеток (Q9, CD3⁺CD56⁺), В представляет собой НК-клетки, экспрессирующие CD16 (Q2, CD16⁺CD56⁺), С представляет собой В-клетки (Q5, CD3⁺CD19⁺) и D представляет собой цитотоксичность

в клетках K562 (7AAD⁺, E:T=10:1).

На фиг. 11 приведены характеристики РВМС Донора 1, культивированных в течение 14 дней после процессов замораживания и размораживания, где А представляет собой процент NK-клеток (Q5, CD3⁺CD56⁺), В представляет собой NK-клетки, экспрессирующие CD16 (Q10, CD16⁺CD56⁺), С представляет собой В-клетки (Q1, CD3⁺CD19⁺), D представляет собой цитотоксичность в клетках K562 (7AAD⁺, E:T=10:1).

Техническое выполнение изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Однако эти примеры приведены только для иллюстративных целей, и объем настоящего изобретения ими не должен ограничиваться.

Пример 1. Получение одноядерных клеток периферической крови (РВМС).

1. Выделение РВМС и аутологичной плазмы из крови.

Кровь отбирали из вены здорового человека. При выполнении этой процедуры использовали канюлю для взятия крови, содержащую гепарин. Каждые 30 мл взятой у пациента крови осторожно переносили в две пробирки (#352070, BD, или эквивалентную, или с лучшей спецификацией) с Ficoll (#17-1440-02, GE Healthcare, или эквивалент, или с лучшей спецификацией). Пробирки с кровью центрифугировали в течение 10 мин при 2500 об/мин с отламыванием и затем каждый верхний слой плазмы переносили в новую пробирку.

Перенесенную плазму инактивировали в течение 30 мин в термоблоке, а затем центрифугировали в течение 5 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость в пробирке после центрифугирования переносили в другую, новую пробирку с этикеткой "плазма" и хранили при температуре от 2 до 8°C.

Плазму собирали из пробирки, содержащей кровь и Ficoll, после центрифугирования, и светло-желтый слой в оставшемся нижнем слое осторожно переносили в новую пробирку, стараясь не смешивать со слоем красных кровяных телец, и затем в новую пробирку добавляли не содержащий Са/Mg DPBS (физиологический раствор, забуференный фосфатом Дульбекко) (#14190, Gibco). После этого пробирку центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин и надосадочную жидкость затем отбрасывали. Осажденные клетки, оставшиеся после отбрасывания надосадочной жидкости, суспендировали в 5 мл буфера для лизиса красных кровяных телец (#158904, Qiagen). Клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин и надосадочную жидкость отбрасывали и затем в пробирку добавляли не содержащий Са/Mg DPBS, с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин. Осажденные клетки, оставшиеся после отбрасывания надосадочной жидкости, суспендировали в 1 мл культуральной среды Alys505NK-EX (#01410P10, CSTI).

Небольшое количество клеточной суспензии в Alys505NK-EX 100-кратно разбавляли в не содержащем Са/Mg DPBS, и затем небольшое количество разбавленной суспензии смешивали с равным объемом трипанового синего, а затем подсчитывали число клеток и их жизнеспособность, используя гемоцитометр.

2. Замораживание РВМС.

Все суспензии, полученные в примере 1.1, центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин и надосадочную жидкость отбрасывали. Клетки суспендировали в Cryostor CS10 или смеси ALyS505NK-EX+альбумин+DMSO, хранящихся при температуре от 2 до 8°C, таким образом, чтобы число клеток было от 1×10^6 до 100×10^6 клеток/мл. Каждый 1 мл клеточных суспензий отделяли в 2-миллилитровую криогенную ампулу, и первое замораживание выполняли при 0°C в течение периода от 10 до 15 мин, при -12°C в течение периода от 5 до 10 мин и при -42°C в течение периода от 0,5 до 1 мин, используя CRF (программируемые криозамораживатели). После первого замораживания выполняли второе замораживание при -25°C в течение периода от 1 до 3 мин и при -15°C в течение периода от 1 до 3 мин. После второго замораживания выполняли замораживание при -42°C в течение периода от 20 до 40 мин и при -120°C в течение периода от 20 до 50 мин. В альтернативном случае первое замораживание выполняли со скоростью 3°C/мин в интервале температур от 4 до -40°C, второе замораживание выполняли со скоростью 5°C/мин в интервале температур от -40 до -90°C после первого замораживания и дополнительное замораживание выполняли со скоростью 5°C/мин в интервале температур от -90 до -120°C после второго замораживания. Замороженные клетки переносили в LN₂ резервуар на хранение (при температуре ниже -130°C).

3. Размораживание замороженных РВМС.

После установки термоблока на 37°C культуральную среду, дополненную 10% плазмы, помещали в Т колбу. Объем культуральной среды можно подбирать в соответствии с концентрацией клеток, например 4, 6, 8 или 10 мл. Криогенную ампулу, замороженную в примере 2.2, помещали в термоблок для разморозки замороженных РВМС. После размораживания половины замороженных РВМС их переносили в Т колбу с культуральной средой. Затем их инкубировали в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение дня. Культивированные РВМС собирали в пробирку, куда добавляли DPBS, не содержащий Са/Mg, и пробирку центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин, а затем надосадочную жидкость отбрасывали. Выделенные центрифугированием клетки суспендировали в небольшом количестве культуральной среды и подсчитывали число клеток. Жизнеспособность клеток после размораживания показана в табл. 1. Как видно из табл. 1, 93% или больше РВМС, которые были разморожены из замороженного состояния клеток, выжили, что свидетельствует о высокой жизнеспособности.

Таблица 1. Жизнеспособность РВМС после разморозки

Происхождение	Жизнеспособность (%)
Донор 1	98,07
Донор 2	93
Донор 3	97,4

Пример 2. Культивирование НК-клеток.

2.1. Подготовка культуральной колбы с покрытием из фибронектина и гамма-глобулина.

2.1.1. Культуральная колба с покрытием из фибронектина и гамма-глобулина (1).

0,1 мл фибронектина (#FC-010, Millipore) и 0,121 мл гамма-глобулина (#020A1004, Greencross) помещали в 15 мл пробирку и затем туда добавляли 9,779 мл DPBS, не содержащего Ca/Mg. Полученный раствор для покрытия пипеткой вносили в T75 колбу (#156499, Nunc) и давали прореагировать при температуре от 2 до 8°C в течение 16 ч или дольше. Оставшийся после этого раствор для покрытия перед культивированием удаляли, промывая не содержащим Ca/Mg DPBS.

2.1.2. Культуральная колба с покрытием из фибронектина и гамма-глобулина (2).

Культуральную колбу с покрытием из фибронектина и гамма-глобулина готовили таким же образом, что и в примере 2.1.1, за исключением того, что количества фибронектина и гамма-глобулина в примере 2.1.1 только меняли на 10 мкл и 1,21 мл соответственно.

2.1.3. Культуральная колба с покрытием из фибронектина.

0,2 мл фибронектина (#FC-010, Millipore) помещали в 15 мл пробирку и туда же добавляли не содержащий Ca/Mg DPBS, доводя до общего объема, равного 10 мл. Затем культуральную колбу с покрытием только из фибронектина готовили таким же образом, что и в примере 2.1.1.

2.2. Первое культивирование НК-клеток.

2.2.1. Первое культивирование НК-клеток (1).

Суспензию клеток, полученную в примере 1, брали и помещали в колбу с покрытием, подготовленную в примере 2.1, которая была дополнена 1,5 мл аутологичной плазмы, 0,03 мл раствора антитела к НКр46 (#MAB1850, R&D), 0,075 мл IL-18 (#B003-2, R&D) и 13,4625 мл Alys505NK-EX (#01410P10, CSTI), затем культивировали в CO₂ инкубаторе в течение 2-3 дней. После этого добавляли 1,5 мл аутологичной плазмы и 13,5 мл Alys505NK-EX, затем культивировали в CO₂ инкубаторе в течение периода от 1 дня до 2 дней.

2.2.2. Первое культивирование НК-клеток (2).

Все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.2.1, за исключением того, что добавляли 3 мкл раствора антитела к НКр46 (идентичного приведенному выше), 37,5 мкл IL-18 (идентичного приведенному выше) и Alys505NK-EX дважды до общего объема, равного 35,95 мл.

2.2.3. Первое культивирование НК-клеток (3).

Все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.2.1, за исключением того, что добавляли 15 мкл раствора антитела к НКр46 (идентичного приведенному выше), 7,5 мкл IL-12 (#554613, BD) и Alys505NK-EX дважды до общего объема, равного 26,98 мл.

2.2.4. Первое культивирование НК-клеток (4).

Все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.2.1, за исключением того, что добавляли 15 мкл раствора антитела к НКр46 (идентичного приведенному выше), 7,5 мкл IL-12 (идентичного приведенному выше), 37,5 мкл IL-18 (идентичного приведенному выше) и Alys505NK-EX дважды до общего объема, равного 26,94 мл.

2.2.5. Первое культивирование НК-клеток (5).

Все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.2.1, за исключением того, что добавляли 0,03 мл раствора антитела к НКр46 (идентичного приведенному выше), 7,5 мл IL-12 (идентичного приведенному выше), 12,5 мкл IL-15 (#247-1L-0025, R&D), 37,5 мкл IL-18 и Alys505NK-EX дважды до общего объема, равного 26,913 мл.

2.3. Второе культивирование НК-клеток.

2.3.1. Второе культивирование НК-клеток (1).

После первого культивирования согласно примеру 2.2.1 культивированные клетки в колбе T75 в инкубаторе собирали и переносили в колбу T175 (#159910, Nunc), которая была дополнена 3 мл аутологичной плазмы и 27 мл Alys505NK-EX (#01410P10, CSTI), культивировали в CO₂ инкубаторе в течение периода от 1 дня до 2 дней. После этого добавляли 6 мл аутологичной плазмы, 0,12 мл раствора антитела к НКр46, 0,03 мл IL-18 и 53,85 мл Alys505NK-EX (#01410P10, CSTI), затем культивировали в CO₂ инкубаторе в течение периода от 1 дня до 2 дней.

2.3.2. Второе культивирование НК-клеток (2).

Для второго культивирования культуры, полученной в примере 2.2.2, все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.3.1, за исключением того, что использовали 0,06 мл раствора антитела к НКр46 (#MAB1850, R&D), 0,06 мл IL-18 (#B003-2, R&D) и 53,88 мл Alys505NK-EX.

2.3.3. Второе культивирование НК-клеток (3).

Для второго культивирования культуры, полученной в примере 2.2.2, все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.3.1, за исключением того, что использовали 0,12 мл раствора антитела к НКр46 (#MAB1850, R&D), 0,03 мл IL-12 (#554613, BD) и 53,85 мл Alys505NK-EX.

2.3.4. Второе культивирование НК-клеток (4).

Для второго культивирования культуры, полученной в примере 2.2.4, все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.3.1, за исключением того, что использовали 0,06 мл раствора антитела к НКр46 (#MAB1850, R&D), 0,03 мл IL-12 (идентичного приведенному выше), 0,02 мл IL-18 (идентичного приведенному выше) и 44,89 мл Alys505NK-EX.

2.3.5. Второе культивирование НК-клеток (5).

Для второго культивирования культуры, полученной в примере 2.2.5, все процедуры выполняли таким же образом, что и в примере 2.3.1, за исключением того, что использовали 0,06 мл раствора антитела к НКр46 (#MAB1850, R&D), 0,03 мл IL-12 (идентичного приведенному выше), 0,06 мл IL-15 (идентичного приведенному выше), 0,02 мл IL-18 (идентичного приведенному выше) и 62,83 мл Alys505NK-EX.

2.4. Третье культивирование НК-клеток.

Клетки из T175 колбы, культивированные в примере 2.3, и аутологичную плазму вносили в культуральную среду, дополненную 300 МЕ/мл IL-2, и культивировали в CO₂ инкубаторе. Через 2-3 дня новую культуральную среду (дополненную 300 МЕ/мл IL-2) смешивали в равных объемах с клеточной суспензией, в которой культивировали клетки, и затем культивировали в CO₂ инкубаторе.

При вышеупомянутом культивировании (во всех культивированиях - первом, втором и третьем) не содержащую IL-2 культуральную среду для иммунных клеток можно дополнять заранее определенным количеством IL-2 и затем использовать вместо культуральной среды с добавленным IL-2.

Пример 3. Определение пролиферации и активации культивированных НК-клеток.

3.1. Определение общего числа культивированных клеток и порядок увеличения числа НК-клеток.

Все клетки, культивированные в примере 2.4, собирали и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Затем надосадочную жидкость отбрасывали и клетки суспендировали в фосфатном буферном растворе. 10 мкл клеточной суспензии разбавляли фосфатным буферным раствором и 10 мкл разбавленного раствора смешивали с 10 мкл трипанового синего. Смесь помещали в гемоцитометр, подсчитывали количество клеток и измеряли их жизнеспособность. Число клеток подсчитывали, используя следующую формулу: (число живых клеток + число мертвых клеток) × 1/4 × 2 × разведение × общий объем × 10⁴, а жизнеспособность клеток рассчитывали по следующей формуле: число живых клеток - (число живых клеток + число мертвых клеток) × 100.

Экспериментальные условия, использованные в настоящем изобретении, и результаты сведены в табл. 2, фиг. 2 и фиг. 8.

Таблица 2

№	Покрытие в колбе		mAb		Цитокин				Число клеток (x10 ⁷ клеток)		НК-клетки (%)		Лизис K562 (%)	
	Фибронектин	Гамма-глобулин	НКр46	IL-2	IL-12	IL-15	IL-18	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	
1			о	о				68	9,8	21,3	5,1	0	0	
2	о		о	о				96	11,12	25,6	3,4	0	0	
3	о	о	о	о				318	46,47	41,8	2,46	78	1,47	
4				о	о			226	45,22	54,3	6,17	36	2,42	
5				о	о		о	264	34,13	66,1	4,46	41	1,46	
6				о	о	о	о	248	59,14	65,6	3,47	39	3,55	
7				о			о	496	67,13	74,2	4,47	43	2,42	
8			о	о			о	494	53,2	77,1	4,4	56	3,4	
9	о	о	о	о	о			226	25,13	57,7	4,46	81,8	3,47	
10	о	о	о	о	о		о	260	32,14	68,3	2,17	82,9	1,17	
11	о	о	о	о	о	о	о	250	44,14	68,9	3,14	76,9	2,17	
12	о	о	о	о			о	504	45,14	78,1	3,47	82,7	1,46	

В совокупности комбинация IL-2 и IL-18 была эффективна для повышения числа клеток и процента НК-клеток. IL-12, IL-15, смесь IL-12 и IL-15 или IL-18 были эффективны для повышения процента НК-клеток.

3.2. Определение эффекта НК-клеточной пролиферации в зависимости от концентрации первого интерлейкина.

Суспензию клеток, полученную в примере 1, брали и помещали в колбу с покрытием, подготовленную в примере 2.1. Туда же вносили 1,5 мл аутологичной плазмы, 0,03 мл раствора антитела к НКр46 (#MAB1850, R&D), 0,075 мл IL-18 (#B003-2, R&D) и 13,4625 мл Alys505NK-EX (#01410P10, CSTI) без IL-2 и добавляли IL-2 с концентрацией от 0 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл (фиг. 3), затем культивировали в CO₂ инкубаторе в течение 14 дней. Через 14 дней культивированные клетки центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин и надосадочную жидкость отбрасывали. Клетки суспендировали в фосфатном буферном растворе. 10 мкл клеточной суспензии разбавляли фосфатным буферным раствором и 10 мкл разбавленного раствора смешивали с 10 мкл трипанового синего. Смесь помещали в гемоцитометр и подсчитывали количество клеток. Количество клеток подсчитывали таким же образом, что и в примере 3.1. Число

НК-клеток подсчитывали на основании процентного содержания НК-клеток, определенного проточной цитометрией. 100 МЕ/мл IL-2 принимали за 1 и рассчитывали кратность увеличения количества НК-клеток в зависимости от концентрации IL-2.

Как показано на фиг. 3, при концентрациях IL-2 в интервале от 500 до 5000 МЕ/мл наблюдали 6-кратное или более увеличение пролиферации НК-клеток по сравнению с 100 МЕ/мл IL-2.

3.3 Определение активности НК-клеток в зависимости от концентрации второго интерлейкина.

1 мкл фибронектина (#FC-010, Millipore) и 1,21 мкл гамма-глобулина (#020A1004, Greencross) помещали в 1,7 мл пробирку и затем туда добавляли 97,79 мкл DPBS, не содержащего Ca/Mg. Полученный раствор для покрытия пипеткой вносили в 96-луночный планшет (#167008, Nunc) и давали прореагировать при температуре от 2 до 8°C в течение 16 ч. Оставшийся после этого раствор для покрытия перед культивированием удаляли, промывая не содержащим Ca/Mg DPBS. Суспензию клеток, полученную в примере 1, брали и вносили в 96-луночный планшет и затем туда добавляли 10 мкл аутологичной плазмы, 0,2 мкл раствора антитела к NKp46 (#MAB1850, R&D), 89,9 мкл Alys505NK-EX (#01410P10, CSTI) с 1000 МЕ/мл IL-2 и добавляли IL-2 с концентрацией от 0 до 10 нг/мл (см. фиг. 4A), а IL-18 добавляли с концентрацией от 0 до 300 нг/мл (см. фиг. 4B) и затем культивировали в CO₂ инкубаторе в течение 48 ч. Через 48 ч надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. В новую пробирку переносили только полученную надосадочную жидкость. Активность НК-клеток определяли по выработанному IFN-гамма, используя IFN-гамма в наборе EILSA (#DIF50, R&D).

Как показано на фиг. 4A и B, высокую выработку IFN-гамма наблюдали при концентрации IL-2 от 0,1 до 10 нг/мл и при концентрации IL-18 от 1 до 100 нг/мл.

3.4. Определение экспрессии активного рецептора культивированных НК-клеток.

Поверхностные антигены НК-клеток, собранные в примере 2, анализировали, используя проточную цитометрию. Точнее, собранные клетки суспендировали в не содержащем Ca/Mg DPBS и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Затем надосадочную жидкость отбрасывали и собирали клеточный осадок. Антитела (CD3-FITC, CD56-APC и CD16-PE), содержащие флуоресцентные материалы, добавляли к осадку и инкубировали 20 мин при 4°C. Затем добавляли FACS буфер, центрифугировали один раз в течение 1 мин при 8000 об/мин и проводили анализ с помощью проточной цитометрии (FACSCalibur, BD). Результаты показаны на фиг. 5.

Как показано на фиг. 5, клетки, пролиферированные согласно конкретному варианту осуществления, продемонстрировали высокие уровни экспрессии CD56 и CD16 и низкую экспрессию CD3 по сравнению с PBMC до пролиферации.

Экспрессия активных рецепторов НК-клеток исследовали проточной цитометрией. Точнее, собранные клетки суспендировали в не содержащем Ca/Mg DPBS и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость затем отбрасывали и собирали клеточный осадок. Антитела (KIRDL1-PE, NKG2A-PE, NKG2D-PE, NKp30-PE и NKp44-PE, NKp46-PE), содержащие флуоресцентные материалы, добавляли к осадку и инкубировали 20 мин при 4°C. Затем добавляли FACS буфер, осадок центрифугировали один раз в течение 1 мин при 8000 об/мин и затем проводили анализ с помощью проточной цитометрии (Guava 8HT, MERK). Результаты показаны на фиг. 6.

Как показано на фиг. 6, клетки, пролиферированные согласно конкретному варианту осуществления, продемонстрировали высокий уровень экспрессии NKG2D, NKp30, NKp44 или NKp46 по сравнению с PBMC до пролиферации.

3.5. Анализ противораковой способности культивированных НК-клеток.

1) Анализ экспрессии противораковых веществ.

Экспрессию противораковых веществ НК-клетками, полученными в примере 2, анализировали проточной цитометрией. Точнее, собранные клетки суспендировали в не содержащем Ca/Mg DPBS и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость затем отбрасывали и собирали клеточный осадок. Полученный клеточный осадок обрабатывали фиксирующим/пермеабилзирующим раствором (#51-2090KZ, BD) и затем обрабатывали антителами (Перфорин-PE, ГранзимВ-PE и TRAIL-PE), содержащими флуоресцентные материалы, соответственно, затем инкубировали 30 мин при 4°C. Затем туда добавляли пермеабилзирующий/промывочный буфер (#51-2091KZ, BD) и дважды центрифугировали 1 мин при 8000 об/мин, а затем проводили анализ с помощью проточной цитометрии (FACSCalibur, BD). Результаты показаны на фиг. 7.

Как показано на фиг. 7, клетки, пролиферированные согласно конкретному варианту осуществления, продемонстрировали высокий уровень экспрессии перфорина, гранзима В или TRAIL по сравнению с PBMC до пролиферации.

2) Определение способности убивать раковые клетки.

K562-клеточную линию хронического миелолейкоза и клеточные линии различных солидных опухолей (Her3B, OVCAR3, HerG2, A704 и DU145) собирали в качестве целевых раковых опухолей и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Все надосадочные жидкости отбрасывали и каждый клеточный осадок собирали и промывали не содержащим Ca/Mg DPBS. К промытому клеточному осадку добавляли культуральную среду, чтобы приготовить клетки с плотностью 5×10^5 клеток/мл. Полученные клетки об-

рабатывали CFSE (#c34554, Life technologies) и затем инкубировали в течение 10 мин в CO₂ инкубаторе. Клетки дважды промывали не содержащим Ca/Mg DPBS и обрабатывали подготовленными НК-клетками, а затем инкубировали 4 ч в CO₂ инкубаторе. Клетки обрабатывали 7AAD за 10 мин до окончания инкубирования. После завершения инкубирования клетки собирали в пробирку. Затем способность полученных клеток убивать раковые клетки анализировали проточной цитометрией (FACSCalibur, BD). Способность убивать раковые клетки рассчитывали по следующему уравнению.

Цитотоксичность (%) = (обработанная группа образцов - спонтанное высвобождение)/(100 - спонтанное высвобождение)×100

Результирующий лизис K562 приведен на фиг. 9 и в табл. 2, а результаты лизиса различных клеточных линий солидных опухолей приведены на фиг. 9.

Следовательно, комбинация антитела к NKp46 и колбы с покрытием из фибронектина и гамма-глобулина продемонстрировала высокую цитотоксичность в отношении K562, а также различных солидных опухолей, включая OVCAR3 (рак яичника), Hep3B (рак печени), HepG2 (рак печени), A704 (рак почки) и DU145 (рак простаты) в соответствии с соотношением Е:Т (число эффекторных клеток:число клеток-мишеней). Эффекторные клетки представляют собой НК-клетки, а клетки-мишени представляют собой раковые клетки.

3.6. Результат культивирования НК-клеток из замороженных РВМС.

РВМС, выделенные из крови 3 доноров, и замороженные РВМС культивировали в течение 14 дней в соответствии со способом пролиферации настоящего изобретения и их свойства анализировали, используя проточную цитометрию, исследуя экспрессию CD3, CD16, CD19 и CD56 и клеточную цитотоксичность к K562.

В результате у донора 1 наблюдалось увеличение числа НК-клеток в 968 раз, а процентное содержание НК-клеток (CD3⁺CD56⁺) увеличилось с 10,5 до 78,8% (табл. 3, фиг. 10 и 11).

Таблица 3. Число и жизнеспособность клеток, культивированных в течение 14 дней из РВМС до культивирования и из замороженных РВМС

№	Происхождение	Клетка-мишень	Общее число клеток	Число НК-клеток	Жизнеспособность (%)
1	Донор 1	РВМС	3×10 ⁷	3,2×10 ⁶	100
		14 дней	3,9×10 ⁹	3,1×10 ⁹	97,4
2	Донор 2	РВМС	3,33×10 ⁷	5,1×10 ⁶	93,69
		14 дней	5,4×10 ⁹	4,2×10 ⁹	96,73
3	Донор 3	РВМС	3×10 ⁷	8,5×10 ⁶	98,1
		14 дней	3,1×10 ⁹	2,66×10 ⁹	94,6

У донора 2 наблюдалось увеличение числа НК-клеток в 823 раза (табл. 3), а процентное содержание НК-клеток (CD3⁺CD56⁺) увеличилось с 15,2 до 77,2% (табл. 4).

Таблица 4. Свойства клеток, культивированных в течение 14 дней из РВМС до культивирования и из замороженных РВМС

№	Происхождение	Клетка-мишень	Определение фенотипа (%)			Цитотоксичность (%)
			CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺	
1	Донор 1	РВМС	10,5	11,2	8,08	4,03
		14 дней	78,8	86,1	0,34	82,36
2	Донор 2	РВМС	15,2	13,2	8,72	5,89
		14 дней	77,2	84,7	0,14	79,93
3	Донор 3	РВМС	28,4	5,88	16,6	6,8
		14 дней	85,8	90	0,07	90,6

Результаты указывают на то, что НК-клетки можно получать из замороженных РВМС способом, включающим замораживание и размораживание РВМС, и способом, включающим культивирование НК-клеток согласно настоящему изобретению.

По прочтении подробного описания настоящего изобретения специалистам в данной области понятно, что подробное описание представляет собой всего лишь предпочтительные варианты осуществления, и объем настоящего изобретения ими не ограничивается. Поэтому значительный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ пролиферации естественных клеток-киллеров, причем способ включает культивирование естественных клеток-киллеров в культуральной среде, содержащей ИЛ-2 в качестве первого интерлейки-

на; IL-18 в качестве второго интерлейкина и антитело к NKp46, где культивирование выполняют в присутствии гамма-глобулина и фибронектина.

2. Способ по п.1, где пролиферация естественных клеток-киллеров представляет собой культивирование одноядерных клеток периферической крови.

3. Способ по п.2, где одноядерные клетки периферической крови находятся в размороженном состоянии после криоконсервации.

4. Способ по п.3, где криоконсервация состоит из первого замораживания при температуре от 4 до -42°C , второго замораживания при температуре от -42 до -15°C и третьего замораживания при температуре от -15 до -120°C .

5. Способ по п.1, где способ пролиферации естественных клеток-киллеров включает в себя первое культивирование культивирования одноядерных клеток периферической крови в культуральной среде на культуральном планшете с покрытием из гамма-глобулина и фибронектина; и второе культивирование, состоящее в дополнительном введении культуральной среды в культуру, полученную при первом культивировании, где культуральная среда содержит IL-2 в качестве первого интерлейкина; IL-18 в качестве второго интерлейкина; антитело к NKp46 и плазму.

6. Способ по п.5, где плазму выделяют из периферической крови, из которой были получены одноядерные клетки периферической крови.

7. Способ по п.5, где концентрация IL-2 в культуральной среде составляет от 500 до 5000 МЕ/мл.

8. Способ по п.5, дополнительно включающий третье культивирование культивирования путем снижения концентрации IL-2 в культуре после второго культивирования до 4/5-1/10 или ниже.

9. Способ по п.8, где концентрация IL-2 в культуральной среде при третьем культивировании составляет от 100 до 1500 МЕ/мл.

10. Способ по п.1, где 70% или более от всех естественных клеток-киллеров, пролиферированных согласно способу, экспрессируют любое одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из CD56, CD16, NKG2D, перфорина и гранзима В.

11. Способ получения естественных клеток-киллеров, причем способ включает пролиферацию естественных клеток-киллеров согласно способу по любому из пп.1-10 и консервирование пролиферированных клеток после суспендирования в растворе, содержащем декстран и альбумин.

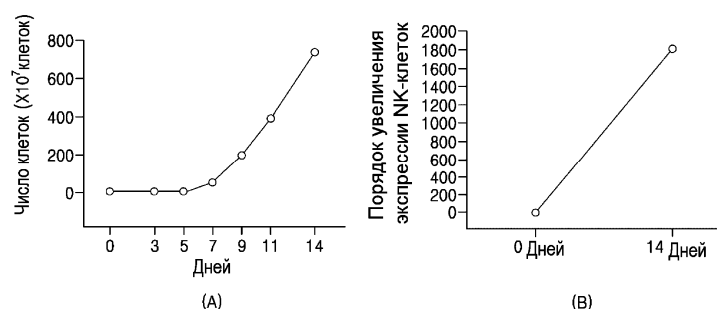
12. Фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения онкологического заболевания, причем фармацевтическая композиция включает естественные клетки-киллеры, пролиферированные согласно способу по любому одному из пп.1-11.

13. Композиция для пролиферации естественных клеток-киллеров, причем композиция содержит IL-2 в качестве первого интерлейкина; IL-18 в качестве второго интерлейкина; антитело к NKp46, где композиция дополнительно включает гамма-глобулин и фибронектин.

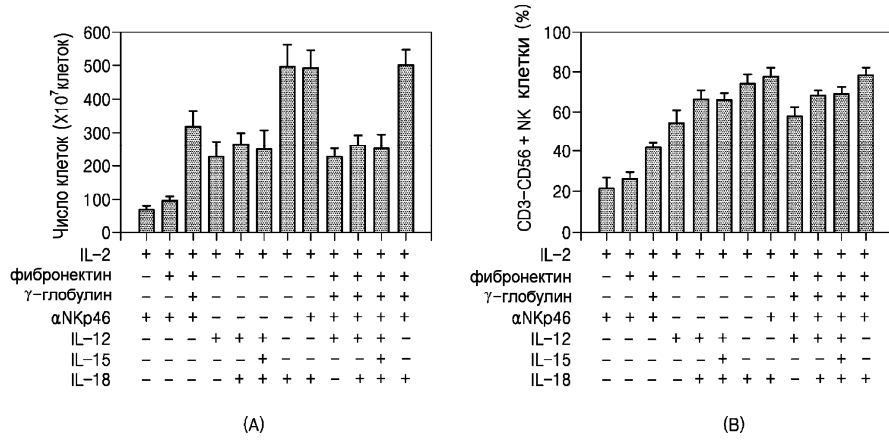
14. Композиция по п.13, где композиция предназначена для пролиферации естественных клеток-киллеров из одноядерных клеток периферической крови.

15. Композиция по п.14, где одноядерные клетки периферической крови находятся в размороженном состоянии после криоконсервации.

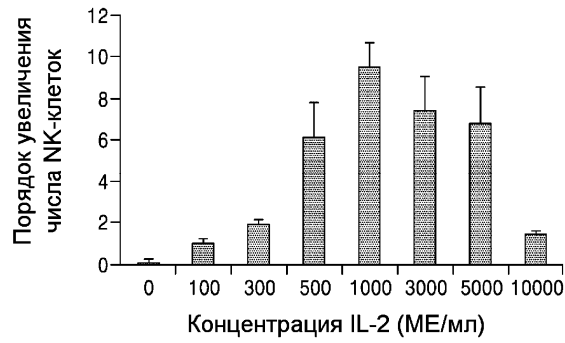
16. Композиция по п.13, где композиция дополнительно включает плазму, выделенную из периферической крови, из которой были получены одноядерные клетки периферической крови.



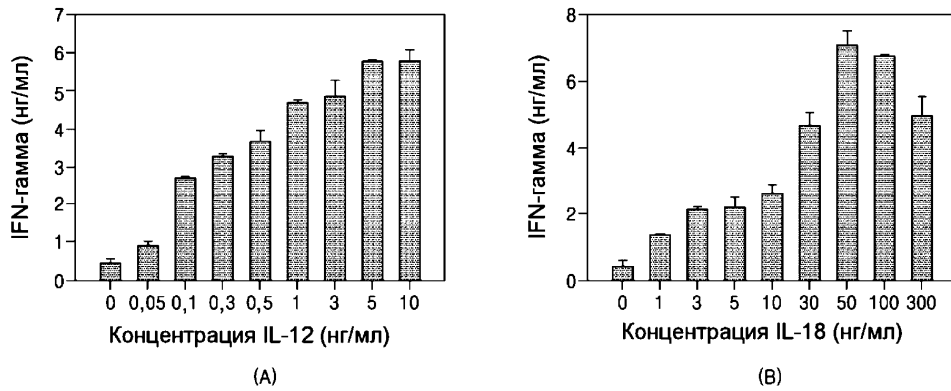
Фиг. 1



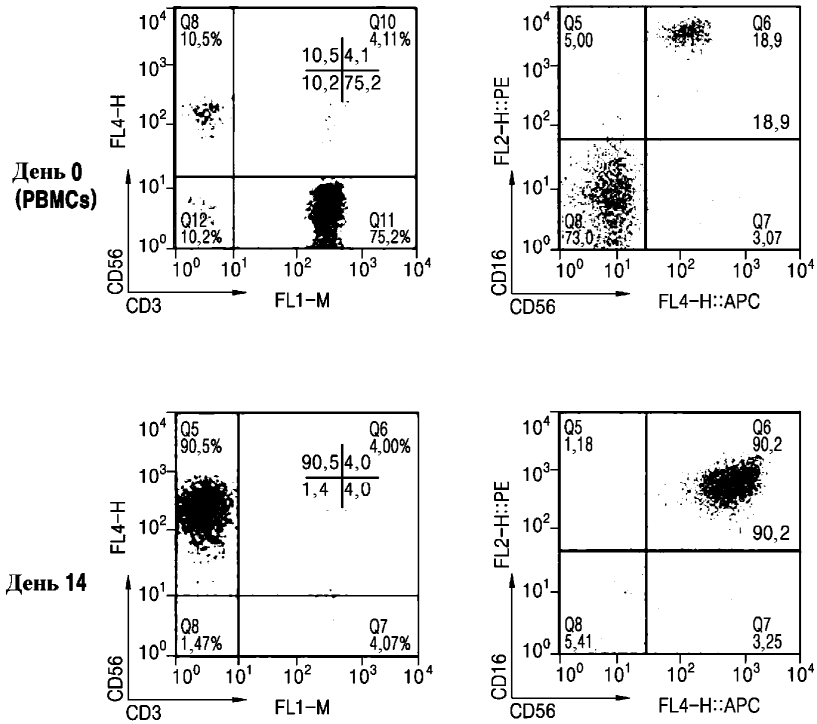
Фиг. 2



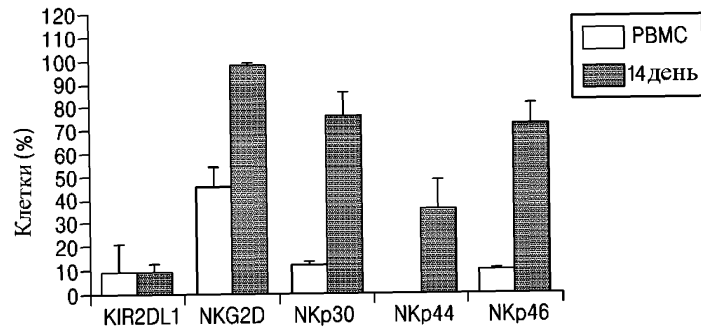
Фиг. 3



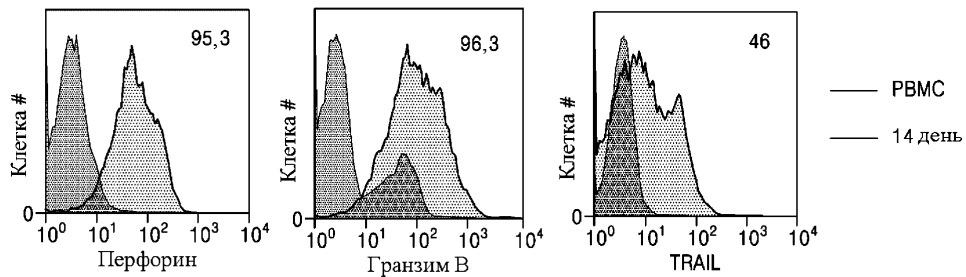
Фиг. 4



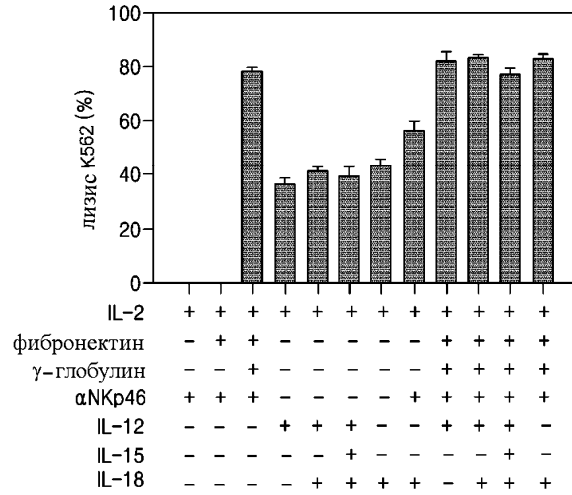
Фиг. 5



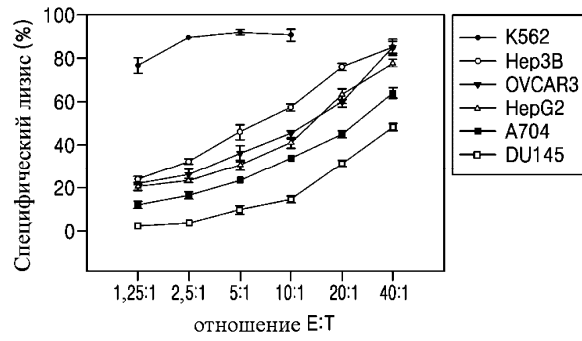
Фиг. 6



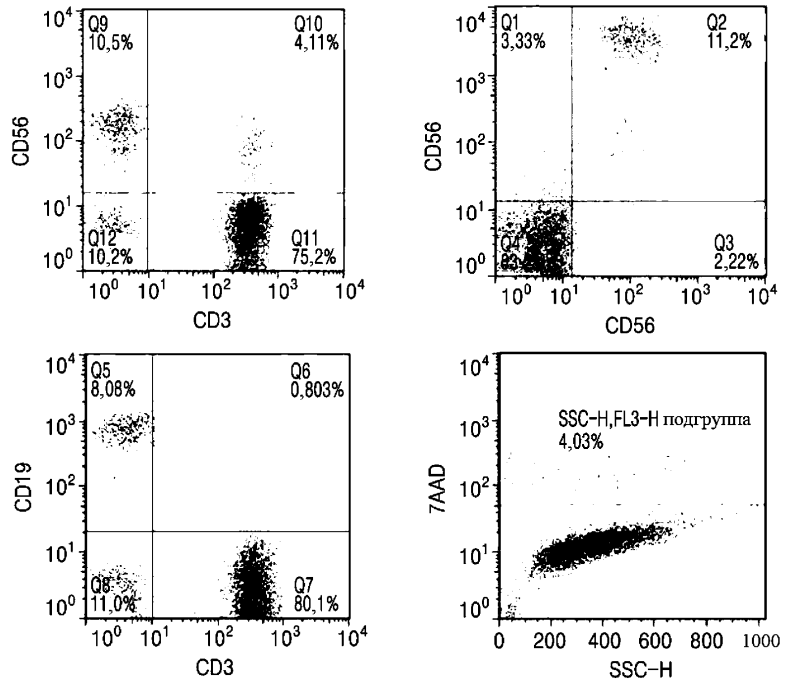
Фиг. 7



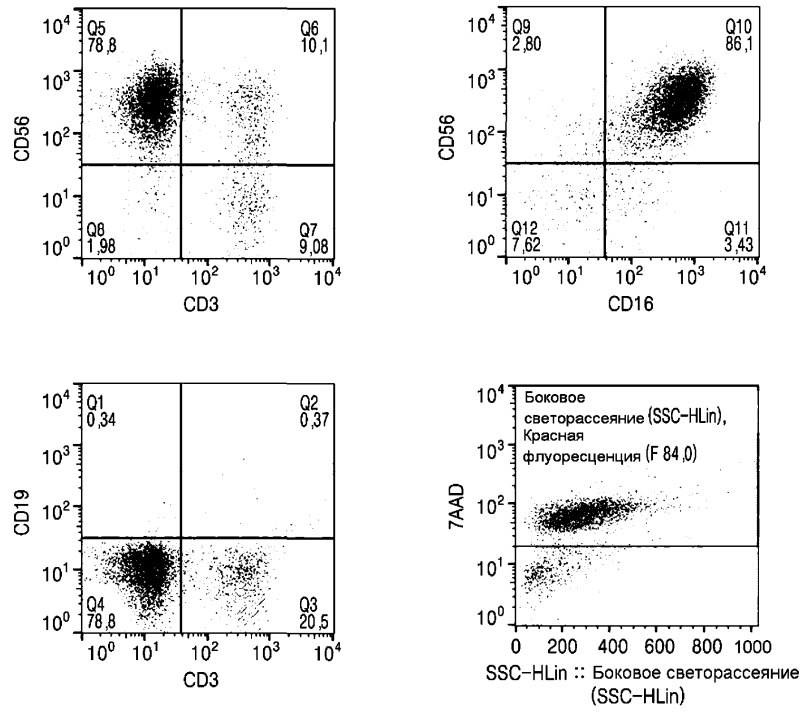
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

