

ИНФИЛЬТРИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ, АКТИВАЦИЯ, АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НА КУЛЬТУРАХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Г.М. Юсубалиева¹, С.В. Петричук², А.Л. Кривошапкин³, А.Г. Кедрова¹, Ю.В. Иванов¹,
А.Г. Винокуров¹, А.А. Калинин¹, А.Е. Санжаров¹, С.В. Ким¹, А.В. Пономарёв¹,
Д.Г. Купцова², Р.В. Ищенко¹, А.В. Троицкий¹, В.П. Баклаушев¹

¹ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация

² Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация

³ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Российская Федерация

Обоснование. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (*tumor infiltrating lymphocytes, TILs*) — один из перспективных источников аутологичных цитотоксических Т-клеток для адоптивной иммунотерапии, уже показавший высокую эффективность в лечении метастазирующей меланомы. Вместе с тем выделение TILs из образцов солидных опухолей представляет существенные технические трудности. Супрессивное опухолевое микроокружение, в частности высокий уровень экспрессии ингибиторов контрольных точек иммунитета (*check-point-ингибиторы*) PD-1 CTLA4, тканевая гипоксия и другие факторы способствуют тому, что Т-клетки, выделенные из опухоли, слабо пролиферируют и не проявляют цитотоксических свойств. Актуальной задачей является активация TILs, выключение иммуносупрессивных механизмов и повышение их противоопухолевой цитотоксической активности. **Цель исследования** — получить панель TILs из операционного материала солидных опухолей (первичные очаги и метастазы аденокарцином различной локализации, меланомы, глиобластома), изучить их популяционный состав и разработать протоколы очистки, наращивания и активации CD4+, CD8+ цитотоксических противоопухолевых лимфоцитов. **Методы.** В данном исследовании мы выделяли TILs из операционного материала, полученного при резекции солидных опухолей (первичные очаги и метастазы аденокарцином различной локализации, глиобластома, меланомы), изучали их популяционный состав и разрабатывали протоколы очистки, наращивания и активации CD4+, CD8+ цитотоксических противоопухолевых лимфоцитов. Клетки выделяли из образцов резецированных опухолей у 16 пациентов; в каждом случае получали аутологичную пару: культуру первичной опухоли и культуру TILs. Выделить жизнеспособные лимфоциты удалось в 100% случаев. Выделенные TILs успешно наращивали в разработанной нами специализированной среде с использованием различных комбинаций IL2, IL7, IL15, IL21, анти-CD3 и анти-CD28. **Результаты.** Иммунофенотипирование показало, что полученные TILs представляют собой гетерогенную смесь иммунных клеток, содержащую следующие популяции: CD3+CD8+CD45+ (цитотоксические Т-клетки), CD3+CD4+CD45+ (Т-хелперы), CD4+CD25+CD127- (Т-регуляторные клетки), CD3-CD56+CD45+ (NK-клетки), CD3+CD56+CD45+ (Т-NK-клетки). Исходные культуры TILs также характеризовались высоким уровнем экспрессии PD-1, что свидетельствовало об их низкой противоопухолевой цитотоксичности. Применяя модифицированные протоколы очистки, наращивания и активации, нам удалось получить клеточный препарат, содержащий 80% CD8+ PD-1- активированных TILs в количестве, достаточном для проведения адоптивной иммунотерапии (5×10^8 и более). *In vitro* исследование цитотоксичности полученных TILs на первичных культурах гомологичных опухолей с помощью клеточного анализатора RTCA Icelligence показал высокую цитотоксичность, обеспечивающую почти 100% гибель опухолевых клеток. **Заключение.** Разработанный нами протокол получения и активации TILs может быть рекомендован для проведения I–II фазы клинических испытаний адоптивной иммунотерапии рекуррентных, активно метастазирующих солидных опухолей.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, солидные опухоли, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, TILs, Т-регуляторные клетки, CTL.

(Для цитирования: Юсубалиева Г.М., Петричук С.В., Кривошапкин А.Л., Кедрова А.Г., Иванов Ю.В., Винокуров А.Г., Калинин А.А., Санжаров А.Е., Ким С.В., Пономарёв А.В., Купцова Д.Г., Ищенко Р.В., Троицкий А.В., Баклаушев В.П. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты: выделение, активация, анализ цитотоксичности на культурах солидных опухолей. *Клиническая практика*. 2020;11(1):49–58. doi: 10.17816/clinpract33974)

TUMOR INFLATING LYMPHOCYTES. PURIFICATION, EXPANDING AND CYTOTOXICITY ANALYSIS ON PRIMARY TUMOR CULTURES

G.M. Yusubaliev¹, S.V. Petrichuk², A.L. Krivoschapkin³, A.G. Kedrova¹, Yu.V. Ivanov¹, A.G. Vinokurov¹, A.A. Kalinkin¹, A.E. Sandjarov¹, S.V. Kim¹, A.V. Ponomarev¹, D.G. Kuptsova², R.V. Ischenko¹, A.V. Troitsky¹, V.P. Baklaushev¹

¹ Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

² National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

³ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Moscow, Russian Federation

Background. Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) is one of the most promising sources of autologous cytotoxic T-cells for adoptive immunotherapy, which has already shown high efficiency in the treatment of metastatic melanoma. However, the isolation of TILs from solid tumors is technically difficult. A suppressive tumor microenvironment, in particular, a high level of expression of check-point inhibitors PD-1, CTLA4, tissue hypoxia and other factors cause that T cells isolated from the tumor do not proliferate well and do not exhibit cytotoxic properties. **Aims.** In this study, we isolated TILs from surgical material obtained by resection of solid tumors (primary and metastatic adenocarcinomas of various localization, melanoma, glioblastoma), studied their population composition and developed protocols for the purification, expansion, and activation of CD4⁺, CD8⁺ cytotoxic antitumor lymphocytes. **Methods.** An urgent task is the activation of TILs, turning off immunosuppressive mechanisms and increasing their antitumor cytotoxic activity. Various approaches are used for this: activation by a cocktail of cytokines and antibodies, editing the lymphocyte genome by knocking out suppressor genes or, conversely, transduction of activating genes, coinoculation with feeder cells, etc. Cells were obtained from samples of resected tumors in 16 patients; in each case we obtain an autologous pair: the primary tumor culture and the TILs culture. **Results.** We could isolate viable lymphocytes in 100% of cases. Isolated TILs were successfully expanded in our specialized medium using various combinations of IL-2, IL-15, IL-21, IL-7, anti-CD3 and anti-CD28. Immunophenotyping showed that the obtained TILs are a heterogeneous mixture of CD4⁺, CD8⁺ cells containing populations of CD3⁺CD8⁺CD45⁺ (CTL), CD3⁺CD4⁺CD45⁺ (T-helpers), CD4⁺CD25⁺CD127⁺ (T-regulatory cells), CD3⁺CD56⁺CD45⁺ (NK-cells), CD3⁺CD56⁺CD45⁺ (T-NK-cells). The initial cultures of TILs were also characterized by a high level of PD1 expression, indicating their low antitumor cytotoxicity. Using different protocols of isolation, expansion, and activation, we obtained a cell preparation containing 80% of CD8⁺ PD-1-activated TILs in an amount sufficient for adoptive therapy (500×10⁶ or more). An *in vitro* study of the cytotoxicity of obtained TILs in primary cultures of homologous tumors using RTCA Celligence showed high cytotoxicity, providing almost 100% tumor cell death. **Conclusion.** Our developed protocol for the production and activation of TILs can be recommended for the phase I–II clinical trials of adoptive immunotherapy of recurrent, highly metastatic solid tumors.

Keywords: adoptive immunotherapy, solid tumors, tumor infiltrating lymphocytes, TILs, Tregs, CTL.

(For citation: Yusubaliev GM, Petrichuk SV, Krivoschapkin AL, Kedrova AG, Ivanov YuV, Vinokurov AG, Kalinkin AA, Sandjarov AE, Kim SV, Ponomarev AV, Kuptsova DG, Ischenko RV, Troitsky AV, Baklaushev VP. Tumor Infiltrating Lymphocytes. Purification, Expanding and Cytotoxicity Analysis on Primary Tumor Cultures. *Journal of Clinical Practice*. 2020;11(1):49–58. doi: 10.17816/clinpract33974)

ОБОСНОВАНИЕ

Адоптивная иммунотерапия — применение с терапевтической целью иммунных клеток, выращенных и активированных *ex vivo*, — один из современных альтернативных методов противоопухолевой терапии, который применяют как вместе со стандартной терапией, так и вместо нее, в качестве «терапии отчаяния» при полирезистентных

опухолях с множественными метастазами [1–4]. Одним из источников цитотоксических клеток для иммунотерапии являются инфильтрирующие опухоль лимфоциты (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) [5]. В отличие от иммунных клеток, полученных из крови [6], TILs выделяются из опухолевой ткани, поэтому считается, что они обладают тропностью именно к опухолевым клеткам [3]. С момента опи-

сания этой технологии в 1987 г. группой Стивена Розенберга [5] до настоящего времени получение TILs было сложной, трудоемкой и индивидуализированной лабораторной процедурой. Самим разработчикам технологии понадобилось более 20 лет, чтобы в клинических исследованиях доказать эффективность технологии в терапии метастатической меланомы [7, 8]. Попытки терапии других солидных опухолей с помощью TILs до последнего времени нельзя было назвать успешными [9–13].

Альтернативной технологией нацеливания на опухоль является применение CAR-T-клеток, несущих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR), распознающий тот или иной таргетный антиген на опухолевых клетках [14]. Однако CAR-T-клетки могут распознавать, как правило, лишь один [15–17] или, в случае бивалентных CAR, два антигена [18]. Тривалентные CAR, хотя и описаны для ряда солидных опухолей [19], но еще не дошли до этапа клинических испытаний. В отличие от CAR-T-клеток, TILs могут распознавать широкий перечень антигенов, уникальных для опухолевых клеток пациента [11]. Группа Розенберга, осуществившая внедрение иммунотерапии TILs в лечение метастатических меланом, и ряд других коллективов к 2018 г. показали возможность применения этой технологии в лечении рака молочной железы, включая трипл-негативный (англ. triple — *тройной*) вариант [20–22]. С 2011 г. одна из крупнейших биотехнологических компаний IOVANCE (США) получила лицензию на технологию TILs и в настоящее время находится на пороге получения одобрения FDA TIL для прогрессирующего рака шейки матки и метастатической меланомы [23].

С точки зрения популяционного состава, TILs представляют собой гетерогенную смесь субпопуляций иммунных клеток, включающую Т-, В-, НК-клетки, макрофаги и дендритные клетки [21, 24–26]. Состав и функциональное состояние TILs может сильно варьировать в зависимости от вида опухоли, стадии заболевания, проводимой терапии, способа выделения и культивирования [27]. Вместе с тем именно популяционный состав и активационный статус противоопухолевых иммунных клеток имеет решающее значение для разработки эффективной и воспроизводимой иммунотерапии с помощью TILs [28].

Цель настоящего исследования — получить панель TILs из операционного материала солидных опухолей (первичные очаги и метастазы аденокарцином различной локализации, меланом,

глиобластома), изучить их популяционный состав и разработать протоколы очистки, наращивания и активации CD4+, CD8+ цитотоксических противоопухолевых лимфоцитов.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

В исследовании приняли участие 16 пациентов, получавших хирургическое лечение в ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России» по поводу злокачественных опухолей нейроэпителиального происхождения (глиобластома, 7 пациентов), рака легкого (2 пациента), рака яичника (2 пациента), метастазов колоректального рака в печень (2 пациента); метастазов меланомы в печень (2 пациента); рака шейки матки (1 пациент).

Критерии соответствия

В исследование отбирали нейроэпителиальные опухоли IV грейда (мультиформная глиобластома); а также злокачественные солидные опухоли эпителиального происхождения, соответствующие классификации T4, N3, M1.

Условия проведения

Взятие интраоперационного материала проводилось в оперблоке ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России» (Москва), получение первичных культур опухолей и TILs выполняли в лаборатории клеточных технологий ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России». Иммунофенотипирование проведено на базе Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей (Москва).

Получение клеток первичной опухоли и TIL.

Фрагменты опухолевой ткани с патоморфологически подтвержденным гистотипом промывали стерильным натрий-фосфатным буфером (phosphate buffered saline, PBS) и в условиях стерильного бокса разделяли на две части. Первую часть механически измельчали и ферментативно диссоциировали в растворе 10% коллагеназы I типа, диспазы и 1 мг/мл ДНКазы в термошейкере в течение 30–60 мин при температуре 37°C. Затем в препарат добавляли 10% аутологичной сыворотки и двукратно центрифугировали при 250G. Клетки из осадка высевали на адгезивный пластик в ростовой среде DMEM F12 (Gibco, США) с 10% инактивированной аутологичной сывороткой или универсальной человеческой АВ-сывороткой (Innovative, США) с добавлением антибиотика-антимикотика (Gibco). После 3–5 пассажей первичные культуры опухолей криоконсервировали в жидком азоте.

Вторую часть опухоли механически измельчали до размеров 1–2 мм, переносили в 24-луночные планшеты (Costar, США) и культивировали в специализированной среде Immunocult (США), содержащей 10% аутологичную инактивированную сыворотку пациента, интерлейкин (interleukin, IL) 2 (Milteny biotech, Германия), 50 У/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Sigma, США) в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90% в течение 7 дней. Для улучшения пролиферации лимфоцитов в среду добавляли магнитные микрочастицы Dynabeads™ Human T-Expander CD3/CD28 (11141D, Life Technologies, США). Через 14 дней микрочастицы удаляли с помощью универсального магнита Dynal MPC-S (A13346, Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкциями производителя, подсчитывали количество клеток и переносили в 25 см² матрасы (Eppendorf, США). С целью активации TILs в среду добавляли смесь IL2, IL7, IL15 и IL21 в дозе 10–1000 ед./мл (Milteny biotech, Германия) и в некоторых случаях вместо микрочастиц анти-CD3, anti-CD28 — антитела в концентрации 30 мкг/мл.

Получение аутологичной сыворотки от пациента. Кровь для получения аутологичной сыворотки забирали в пробирки с активатором свертывания крови Vacuette Z Serum Clot Activator collection tubes (Greiner Bio One, Австрия), центрифугировали при 400 g 20 мин, отбирали сыворотку и инактивировали ее нагреванием на водяной бане в течение 40 мин при 56°C.

Проточная цитометрия для анализа фенотипа. Иммунофенотипирование проводили с помощью трехлазерного проточного цитометра ACEA Novocyte (ACEA Bioscience, США). В периферической крови и в культуре выделенных из опухоли лимфоцитов количественно оценивали основные и малые популяции лимфоцитов CD45+ с помощью следующих моноклональных антител: CD3+ (Т-лимфоциты), CD3+CD4+ (Т-хелперы), CD3+CD8+ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD3-CD19+ (В-лимфоциты), CD3-CD16+/CD56+ (NK-клетки), CD3+HLA-DR+ (активированные Т-лимфоциты), CD4+CD127lowCD25high (регуляторные Т-клетки-Treg), CD4+CD25+CD127high (активированные Т-хелперы-Tact), CD3+CD4+CD161+ (Th17-лимфоциты), все антитела производства Beckman Coulter, Sony Biotechnology (США) и Miltenyi Biotec (Германия). Оценивали также экспрессию маркера истощения PD-1 (CD279, BioLegend, США), а также популяцию активированных Т-регуляторных клеток CD4-CD25-aFoxP3 (Treg detection kit; Miltenyi

Biotec, Германия). Для окрашивания клетки промывали PBS (phosphate-buffered saline) с 2% бычьим сывороточным альбумином, 1 mM EDTA, 0,1% азидом натрия. Окрашивание поверхностных маркеров проводили на нефиксированных клетках в течение 20 мин при 4°C. Для окрашивания внутриклеточных маркеров применяли фиксацию 4% параформальдегидом и пермеабиллизацию 0,1% сапонином.

Цитотоксический анализ с помощью RTCA Icelligence. Анализ цитотоксичности TILs в отношении первичных культур опухолевых клеток проводили с помощью клеточного анализатора RTCA Icelligence (ACEA, Biosciences Inc., США). Принцип метода основан на непрерывном измерении импеданса на поверхности планшеты, значение которого коррелирует с плотностью монослоя. Опухолевые клетки мишени высевали в среде DMEM в лунки 8-луночного Е-планшета (10 000 кл./лунка) и культивировали 48 ч до образования 100% конфлюентности монослоя (выход кривой клеточного индекса на плато). После этого к первичным опухолевым культурам добавляли 100 000 (аутологичных или аллогенных) TILs и культивировали с клетками-мишенями в течение 48–72 ч. В качестве контролей использовали лунки с опухолевыми клетками без TILs (положительный контроль) и лунки, в которые добавляли только TILs без клеток-мишеней для исключения фонового импеданса, обусловленного лимфоцитами (отрицательный контроль).

Этическая экспертиза

Исследование проводили согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. Протокол взятия и исследования образцов резецированных опухолей и цельной крови пациентов согласован Локальным этическим комитетом ФНКЦ ФМБА России (протокол № 16 от 30 сентября 2017); все пациенты, участвующие в исследовании, подписывали информированное согласие.

Статистический анализ

При выполнении экспериментов по анализу цитотоксичности сравнение показателей клеточного индекса при инкубации с аутологичными и аллогенными опухольинфильтрирующими иммунными клетками выполняли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Эксперименты выполня-

ли в трех повторах, при этом определяли средние значения и стандартные отклонения значений клеточного индекса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объект исследования

Биоматериал получен от 16 пациентов, находившихся на хирургическом лечении по поводу онкологического заболевания на базе ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России». Были исследованы следующие солидные опухоли: аденокарциномы различной локализации (7 образцов), глиобластома (7 образцов), меланома (2 образца).

Основные результаты исследования

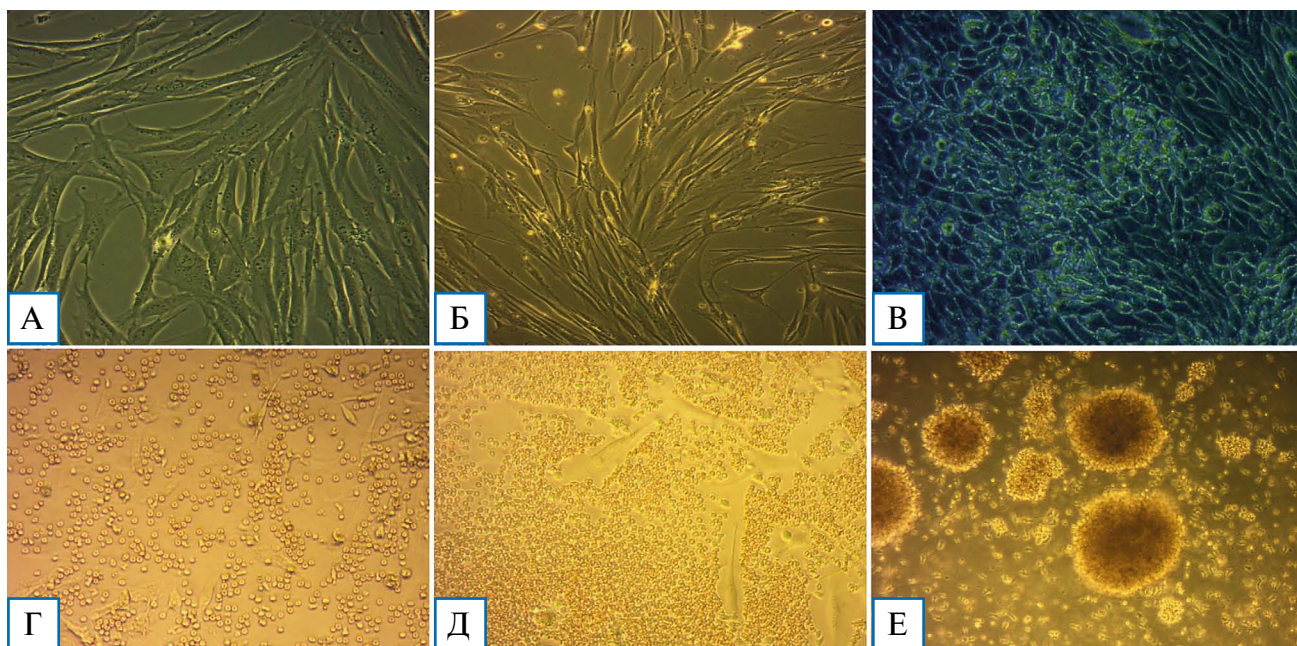
В результате работы из всех 16 образцов интраоперационного материала опухолей удалось помимо первичной культуры клеток солидной опухоли получить культуру TILs. При выделении TILs из больших фрагментов опухоли (объем 1–2 см³) мы применяли протокол быстрого наращивания (REP) [8, 20], при котором выход TILs составлял до 10×10⁶ клеток в течение 24–48 ч. Этого количества достаточно для проведения анализа методом проточной цитометрии в первые сутки и получения необходимого для терапии количества клеток (5×10⁸) в течение недели. Если раз-

мер биоптата составлял менее 0,5 см³ (почти все образцы глиобластомы), применяли обычную механическую диссоциацию и культивирование фрагментов; в этом случае получение культуры TILs затягивалось до 2–3 нед.

Начальное культивирование TILs, полученных из меланомы и аденокарцином, проводили по одному протоколу с добавлением 10–100 мкг/мл IL2. На 6–7-й день культивирования TILs начинали мигрировать из опухолевой ткани, образуя характерный «ковёр» (рис. 1). На данном этапе важно оценить пролиферативный потенциал первых вышедших лимфоцитов. От этого зависит выбор протокола для их дальнейшего успешного культивирования. Модификации протокола заключались в увеличении концентрации экзогенного IL2 до 6000 МЕ/мл, замене IL2 на IL15, времени добавления активирующих антител, выборе фидерных клеток.

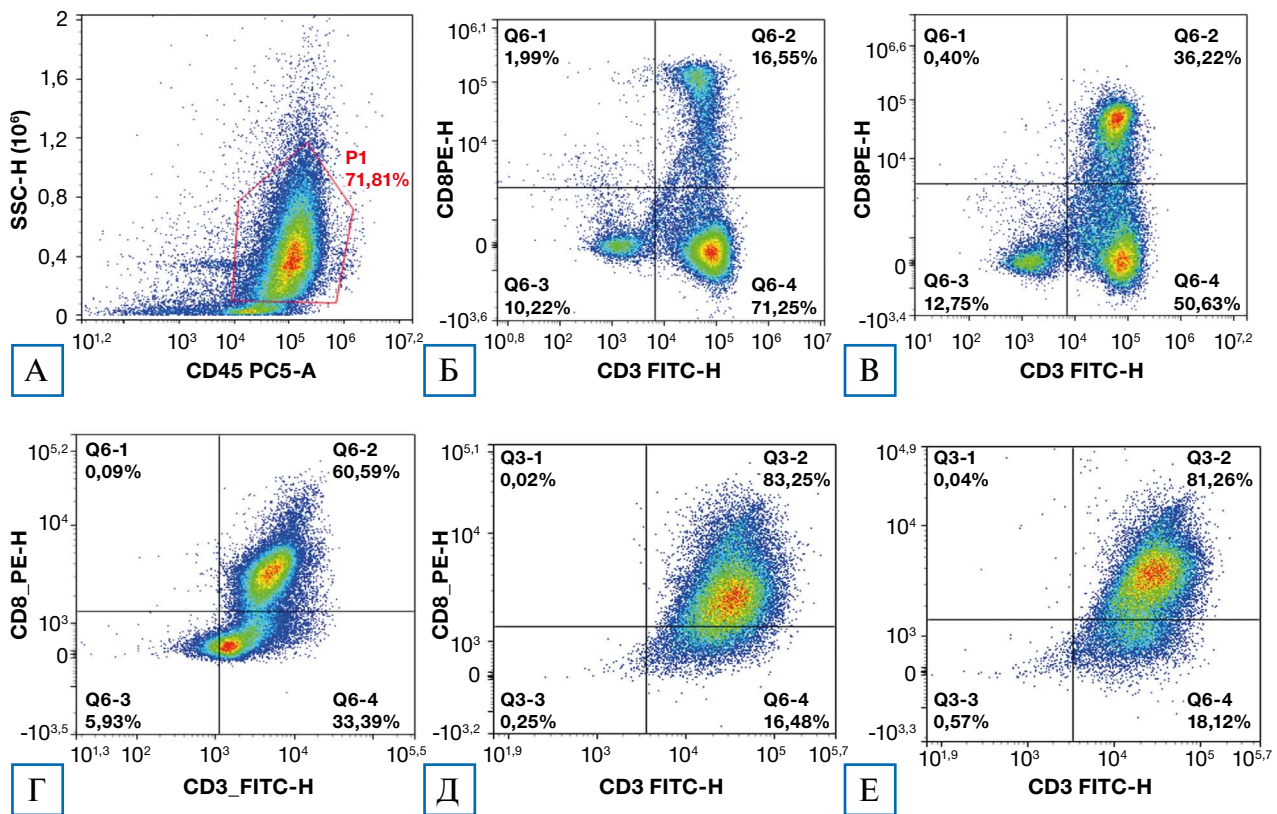
Имунофенотипирование показало, что полученные TILs представляют собой гетерогенную смесь иммунных клеток, содержащую субпопуляции CD3+CD4+, CD3+CD8+ Т-клеток, CD4+CD25+CD127- Т-регуляторных клеток, CD3-CD56+CD45+ NK-клеток, CD3-CD19+ В-клеток. В TILs, полученных из глиобластомы, была также обнаружена мажорная популяция NK-Т-клеток

Рис. 1. Световая микроскопия первичных культур опухолевых клеток (А–В) и первичных культур цитотоксических опухольинфильтрирующих лимфоцитов (Д–Е), ×200, фазовый контраст



Примечание. Полученные опухолевые клетки имеют фибробластоподобный фенотип (А, Б) или железистый фенотип (В). Г, Д — различные стадии культивирования TILs от начальной (Г) до финальной (Е), в которой в большом количестве образуются цитосферы.

Рис. 2. Иммунофенотипирование цитотоксических CD45+ CD3+CD8+ TILs



Примечание. Тестирование вскоре после получения первичной культуры (Б, В) и после культивирования в селективной среде (Г–Е). А — гейтирование CD45+ популяции лимфоцитов, в которой проводили определение CD3+CD8+; Б — исходная культура TILs из аденокарциномы; В — исходная культура TILs из меланомы. Нижний ряд — активированные TILs из аденокарциномы (Г), меланомы (Д) и глиобластомы (Е). Проточная цитометрия на приборе Novocyte (ACEA, США).

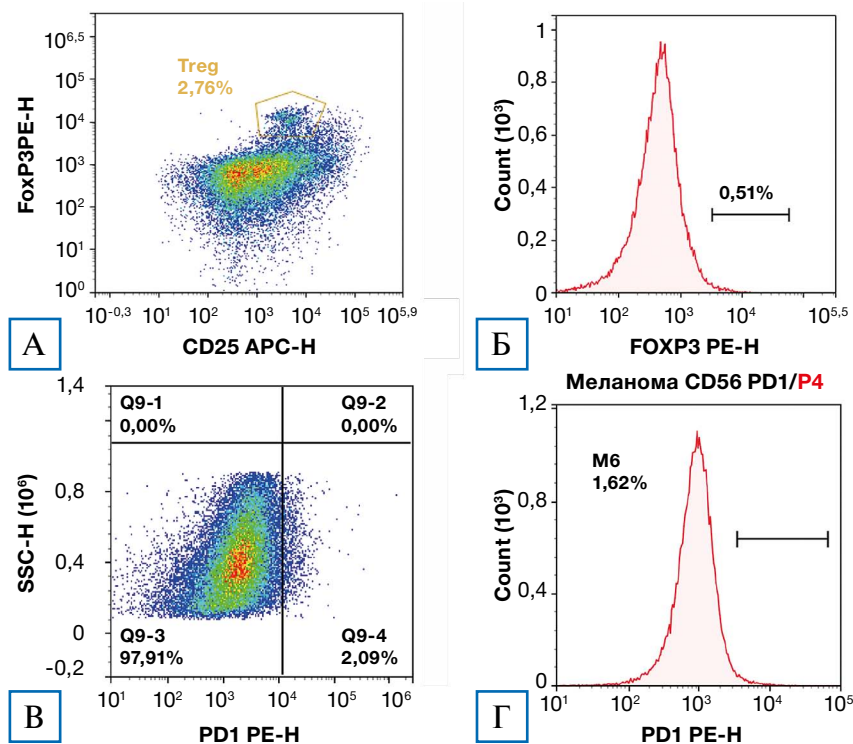
(CD3+CD56+). Доля цитотоксических CD3+CD8+ Т-клеток в культуре TILs варьировала в зависимости от гистогенеза опухоли и стадии заболевания. В препаратах TILs, полученных из аденокарцином, на момент выделения доля CD3+CD8+ клеток оставляла 16–36% (рис. 2, А–В). Наибольшее содержание CD3+CD8+ TILs наблюдалось в культуре, полученной из меланомы (рис. 2, В). В TILs, полученных от пациентов с глиобластомой, содержание цитотоксических CD+CD8+ клеток было минимальным и составляло от 2 до 20%.

Низкая исходная концентрация цитотоксических Т-клеток в препаратах TILs из карцином и особенно из глиобластом может быть одной из причин низкой эффективности адоптивной иммунотерапии этих заболеваний. В процессе наращивания TILs мы пытались увеличить долю цитотоксических Т-клеток и максимально их при этом активировать. В процессе активации в присутствии магнитных микрочастиц CD3/CD28 и/или коктейля IL2, IL7, IL15 и IL21 нам удалось добиться увеличения CD3+CD8+ до 60–90% (рис. 2, Г–Е).

Первичные препараты TILs, особенно лимфоциты, полученные из глиобластомы, характеризовались присутствием значительной доли Т-регуляторных клеток (Tregs), обладающих иммуносупрессивным действием и, таким образом, противопоказанных для введения при адоптивной иммунотерапии. Чтобы избавиться от этой нежелательной в данном случае субпопуляции, мы применяли позитивную селекцию по CD8 (MagneSort™ Human CD8 Positive Selection Kit, ThermoFisher, США). Из препаратов глиобластомы, характеризующихся очень высоким исходным содержанием Tregs (до 80%), мы извлекали их с помощью отрицательной селекции по CD25+ (Dynabeads™ CD25, ThermoFisher). В результате, в конечных препаратах TILs доля Tregs не превышала 1–3% (рис. 3, А, Б).

Исходные культуры TILs также характеризовались высоким уровнем экспрессии чек-пойнт ингибитора PD-1 (до 90%), что свидетельствовало об их низкой противоопухолевой активности. PD-1+-позитивные истощенные TILs в процессе

Рис. 3. Содержание Т-регуляторных клеток и уровень экспрессии маркера истощения цитотоксических лимфоцитов PD-1 в конечной культуре TILs



Примечание. А, Б — проточная цитометрия CD25+ FoxP3+ Tregs (содержание их в препаратах не превышает 3%); В, Г — экспрессия PD-1 (1,62–2,09%).

культивирования и активации переставали экспрессировать ген этого белка, и к окончанию протокола наращивания содержание PD-1+ клеток в культуре TILs не превышало 2,5%, что свидетельствовало об их высоком уровне активации (рис. 3, В, Г).

Полученные препараты TILs исследовали в экспериментах *in vitro* по оценке цитотоксичности в отношении аутологичных и аллогенных первичных опухолевых культур. Было обнаружено, что наибольшую противоопухолевую цитотоксическую активность проявляют активированные аутологичные TILs (рис. 4).

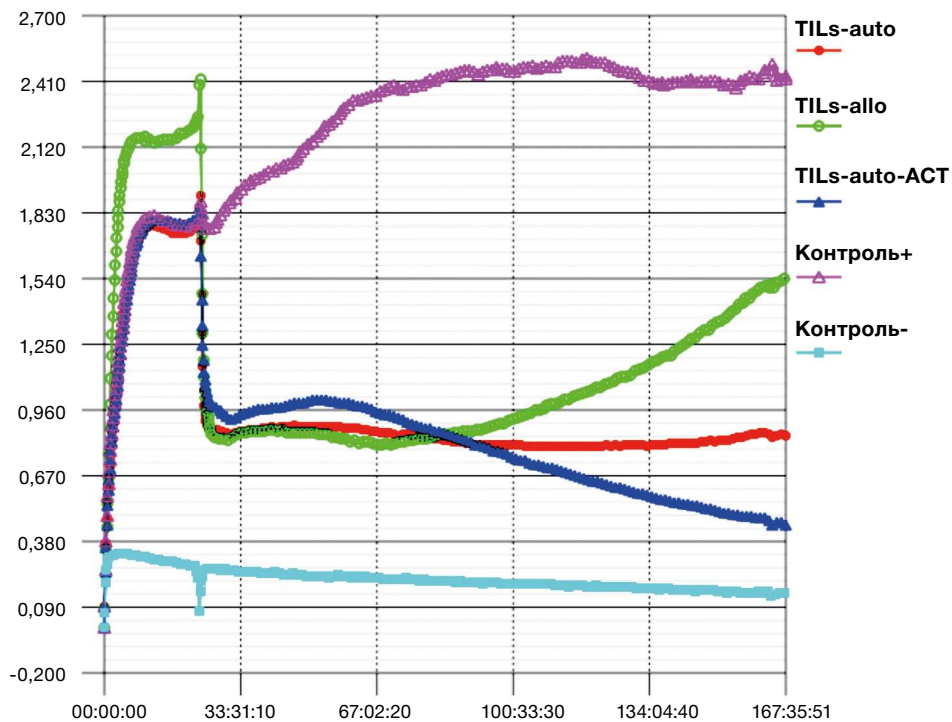
ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании мы одновременно решали несколько задач: получение панели первичных культур солидных опухолей, стандартизация выделения и наращивания TILs из биоптата первичного очага или регионарного/отдаленного метастаза; иммунопрофилирование свежeweделенных TILs и оценка их популяционного состава в процессе культивирования, а также разработка протоколов активации TILs, полученных из различных источников (аденокарцинома, меланома, глиобластома). Создание аутологичной пары первичной культуры

опухолевых клеток и активно пролиферирующей культуры TILs является интересной модельной системой для изучения различных подходов по активации/ингибированию цитотоксичности.

Проведенное исследование показало, что TILs, полученные из разных солидных опухолей, имеют различный исходный состав: наибольшее количество цитотоксических клеток обнаруживается в препарате, полученном из меланомы (до 40%), наименьшее — в препарате из глиобластомы (20% и менее). В последнем случае мажорной популяцией TILs, как правило, являются Т-регуляторные клетки, рекрутирование которых в опухоль усиливает и без того выраженное иммуносупрессивное опухолевое микроокружение и препятствует цитотоксической противоопухолевой активности иммунных клеток. Кроме того, мы обнаружили, что TILs, выделенные из солидных опухолей, характеризуются так называемым «истощенным» фенотипом с повышенной экспрессией PD-1 как в популяции CD4+ Т-хелперов, так и в цитотоксических CD8+ клетках. Предварительные эксперименты с этими клетками показали, что у них практически отсутствует противоопухолевая цитотоксичность. Проанализировав ряд протоколов активирования

Рис. 4. Оценка цитотоксичности полученных препаратов аутологических и аллогенных TILs в отношении культур первичных опухолевых клеток



Примечание. TILs-auto — препарат аутологических TILs; TILs-allo — препарат аллогенных TILs; TILs-auto-ACT — препарат аутологических TILs, активированных по модифицированной методике. По оси абсцисс — время инкубирования TILs с монослойной культурой опухолевых клеток. По оси ординат — клеточный индекс. Различия между показателями в группах TILs-allo, TILs-auto и TILs-auto-ACT достоверны ($p < 0,05$). Исследование с помощью клеточного анализатора RTCA Icelligence (ACEA, США).

TILs, мы синтезировали на их основе оптимальный протокол, характеризующийся последовательным добавлением магнитных микрочастиц CD3/CD28 или аналогичных антител, а также коктейля IL2, IL-7, IL15 и IL21. Цитотоксическая активность полученных таким образом TILs была проверена в экспериментах *in vitro*, показавших преимущество применения аутологических активированных TILs по сравнению с аллогенными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан оптимизированный протокол выделения, наращивания и активации TILs из интраоперационных биоптатов различных солидных опухолей, позволяющий получить клеточный препарат, содержащий до 80% CD8+ PD-1-активированных TILs в количестве, достаточном для проведения адоптивной терапии (5×10^8 и более). Разработанный нами протокол получения и активации TILs может быть рекомендован для проведения I-II фазы клинических испытаний адоптивной иммунотерапии рекуррентных, активно метастазирующих солидных опухолей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-29-01022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, который необходимо обнародовать.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Юсубалиева Г.М. — дизайн исследования, получение, первичных культур опухолевых клеток, получение, наращивание, активация и иммунохимический анализ TILs, написание рукописи; Петричук С.В. Купцова Д.Г. — иммунофенотипирование TILs с помощью проточной цитометрии; Кривошапкин А.Л, Винокуров А.Г, Калинин А.А. — забор и характеристика интраоперационного материала глиобластомы; Кедрова А.Г., Иванов Ю.В., Санжаров А.Е. Ищенко Р.В. — забор и характеристика интраоперационного материала аденокарцином; Пономарёв А.В., Ким С.В., Иванов Ю.В. — забор и характеристика интраоперационного материала метастазов меланомы; Троицкий А.В. — общее

руководство исследованием; Баклаушев В.П. — дизайн исследования, написание рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- June CH, Riddell SR, Schumacher TN. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. *Sci Transl Med*. 2015;7(280):280ps7. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3643.
- Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*. 2015;125:3335–3337. doi: 10.1172/JCI83871.
- Bilusic M, Madan RA, Gulley JL. Immunotherapy of prostate cancer: facts and hopes. *Clin Cancer Res*. 2017;23:6764–6770. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0019.
- Spieß PJ, Yang JC, Rosenberg SA. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst*. 1987;79:1067–1075.
- Chouaib S, Bertoglio J, Blay JY, et al. Generation of lymphokine-activated killer cells: synergy between tumor necrosis factor and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6875–6879.
- Rosenberg SA, Yanelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(15):1159–1166. doi: 10.1093/jnci/86.15.1159.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4550–4557.
- Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, Gilham DE. Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;112(9):1510–1518.
- Hall M, Liu H, Malafa M, et al. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *J Immunol*. 2016;196(1):61. doi: 10.1186/s40425-016-0164-7.
- Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:463–482.
- Jiang S-S, Tang Y, Zhang Y-J, et al. A phase I clinical trial utilizing autologous tumor-infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(38):41339–41349.
- Mina M, Boldrini R, Citti A, et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. *Oncimmunology*. 2015;4(9):e1019981. doi: 10.1080/2162402x.2015.1019981.
- Barrett DM, Singh N, Porter DL, et al. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Ann Rev Med*. 2014;368(6):333–347.
- Yu S, Li A, Liu Q, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):78.
- Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*. 2008;14(11):1264–1270.
- Künkele A, Taraseviciute A, Finn LS, et al. Preclinical assessment of CD171-directed CAR T-cell adoptive therapy for childhood neuroblastoma: CE7 epitope target safety and product manufacturing feasibility. *Clin Cancer Res*. 2017;23(2):466–477. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-16-0354.
- Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Ra2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3036–3052.
- Bielamowicz K, Fousek K, Byrd TT, et al. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018;20(4):506–518.
- Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med*. 2018;24(6):724–730. doi: 10.1038/s41591-018-0040-8.
- Miligy I, Mohan P, Gaber A, et al. Prognostic significance of tumour infiltrating B lymphocytes in breast ductal carcinoma in situ. *Histopathology*. 2017;71(2):258–268. doi: 10.1111/his.13217.
- Harao M, Forget M-A, Roszik J, et al. 4-1BB-enhanced expansion of CD8+ TIL from triple-negative breast cancer unveils mutation-specific CD8+ T cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(6):439–445.
- McCullough M. The world's first T-cell therapy for a solid tumor cancer is made in Philly [cites 2019 September 3]. Available from: <https://www.inquirer.com/health/iovance-t-cells-first-solid-tumor-fda-approval-car-t-20190903.html>.
- Al-Shibli K, Al-Saad S, Andersen S, et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal CD3-, CD117- and CD138-positive cells in non-small cell lung carcinoma. *APMIS*. 2010;118(5):371–382. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02609.x.
- Sinnamon AJ, Sharon CE, Song Y, et al. The prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for primary melanoma varies by sex. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79:245–251. doi: 10.1016/j.jaad.2018.02.066.
- Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015;21(8):938–945.
- Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:20429–20434. doi: 10.1073/pnas.0905139106.
- Fortes C, Mastroeni S, Mannooranparampil TJ, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival. *Melanoma Res*. 2015;25:306–311. doi: 10.1097/CMR.000000000000164.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Юсубалиева Гаухар Маратовна

к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»;
e-mail: gaukhar@gaukhar.org, SPIN-код: 1559-5866, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3056-4889>

Петричук Светлана Валентиновна

д.б.н., профессор, главный научный сотрудник ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ; e-mail: cito@list.ru, SPIN-код: 7026-6160

Кривошапкин Алексей Леонидович

д.м.н., профессор, член-корр РАН, заведующий кафедрой нейрохирургии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: alkr01@yandex.ru, SPIN-код: 8329-8540

Кедрова Анна Генриховна

д.м.н., заведующая онкологическим отделением ФНКЦ ФМБА России, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии Академии постдипломного образования ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»;
e-mail: kedrova.anna@gmail.com, **SPIN-код:** 3184-9760

Иванов Юрий Викторович

д.м.н., заведующий отделением хирургии, профессор кафедры хирургии ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»;
e-mail: ivanovkb83@yandex.ru, **SPIN-код:** 3240-4335,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6209-4194>

Винокуров Алексей Георгиевич

к.м.н., врач-нейрохирург, врач высшей категории, зав. нейрохирургическим отделением ФНКЦ ФМБА России; **e-mail:** avinok@yandex.ru

Калинкин Александр Александрович

к.м.н., врач-нейрохирург ФНКЦ ФМБА России; **e-mail:** aleksandr_kalinkin27@mail.ru, **SPIN-код:** 9919-5834,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1605-9088>

Санжаров Андрей Евгеньевич

врач-уролог, врач высшей категории, заведующий отделением урологии ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»;
e-mail: sanzhh@mail.ru, **SPIN-код:** 5713-5791, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1056-3053>

Ким Сергей Владимирович

врач анестезиолог-реаниматолог ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»; **e-mail:** mr.kims@yandex.ru

Пономарёв Артур Валерьевич

научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»; **e-mail:** limbt@list.ru

Купцова Дарья Геннадьевна

младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;
e-mail: dg.kuptsova@gmail.com, **SPIN-код:** 7476-1524, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7771-3314>

Ищенко Роман Викторович

д.м.н., профессор, заместитель главного врача по хирургической помощи ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»;
e-mail: ishenkorv@rambler.ru, **SPIN-код:** 9021-7370, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7999-8955>

Троицкий Александр Витальевич

д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»; **SPIN-код:** 2670-6662,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2143-8696>

Баклашев Владимир Павлович

д.м.н., заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России»; **e-mail:** baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru, **SPIN-код:** 3968-2971,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1039-4245>